

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

**Caracterização da resistência de *Echium plantagineum* aos herbicidas
inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS)**

Sabrina Tolotti Peruzzo

Passo Fundo 2019

Sabrina Tolotti Peruzzo

Caracterização da resistência de *Echium plantagineum* aos herbicidas inibidores da enzima 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:
Mauro Antônio Rizzardi

Passo Fundo 2019

CIP – Catalogação na Publicação

P471c Peruzzo, Sabrina Tolotti

Caracterização da resistência de *Echium plantagineum* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS)

/ Sabrina Tolotti Peruzzo. – 2019.

99 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Antônio Rizzardi.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. *Echium plantagineum*. 2. Flores - Cultivo. 3. Plantas - Efeito dos herbicidas. 4. Inibidores enzimáticos. I. Rizzardi, Mauro Antônio, orientador. II. Título.

CDU: 632.954

ATA DE DEFESA DE TESE



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

"Caracterização da resistência de *Echium plantaginum* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS)"

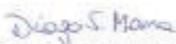
Elaborada por

Sabrina Tolotti Peruzzo

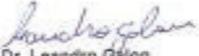
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas"

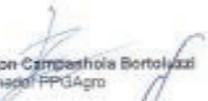
Aprovada em: 25/10/2019
Pela Comissão Examinadora

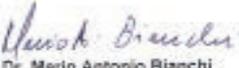

Dr. Marco Antonio Rizzardi
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador


Dr. Diogo da Silva Moura
Desurg


Dr. Anderson Nunes
IFRS


Dr. Leandro Galon
UFFS


Dr. Edson Campastola Bortoluzzi
Coordenador PPGAgro


Dr. Mario Antonio Bianchi
Unicruz


Dr. Eraldo Laurengo Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária,
Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

“Dedico aos meus pais, por todo amor e carinho que recebi durante a elaboração desse trabalho”.

“Dedico o presente trabalho a minha mãe, que foi meu maior apoio nos momentos de angustia. Também quero homenagear meu pai, que fez de tudo para que essa fase se tornar um sonho possível”.

“Dedico a meu irmão Felipe, que me impulsiono todus os dias com palavras de apoio”.

“A meu noivo Ricardo, que não mediu esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida, e me apoiou em cada momento de angustia”.

“Aos amigos de velha e nova jornada, e aos colegas, que me incentivaram todos os dias e ofereceram apoio nos momentos críticos”.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem e por ter iluminado o meu caminho, durante essa jornada.

Aos meus pais, Pedro e Rosane, por terem me ensinado os valores como educação, honestidade, respeito, perseverança. E por serem meu porto seguro. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação, e por me ensinarem a ter asas.

Ao meu irmão, Felipe, pelo amor, companheirismo, apoio, ajuda, amizade, troca de informações. Meu muito obrigada.

Ao meu noivo pelo auxílio, amor, compreensão, dedicação, apoio, amizade. Meu muito obrigada

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Antônio Rizzardi, pelo conhecimento transmitido, pela paciência, incentivo e amizade. Obrigada.

À UPF e à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, pela estrutura necessária para o desenvolvimento e condução do projeto. À CAPES, pela concessão da bolsa do curso de Doutorado.

Aos professores do PPGAgro, pelo conhecimento e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Ecofisiologia de Plantas Daninhas, pelo auxílio no trabalho de campo e pela amizade. Obrigada.

Aos funcionários da UPF, pela ajuda e amizade.

Aos amigos e demais familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram para que eu chegasse até aqui.

EPIGRAFE

Quando tudo parecer dar errado em sua vida, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele (Henry Ford)

RESUMO

PERUZZO, Sabrina Tolotti Caracterização da resistência de *Echium plantagineum* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) / Sabrina Tolotti Peruzzo. – 2019.99 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

O elevado grau de variabilidade genética existente entre populações de plantas, é uma das principais características que permitem a sobrevivência e adaptação das espécies em qualquer condição ambiental de estresse provocado no ambiente. O uso contínuo de um único herbicida ou mecanismo de ação favorece a seleção de plantas daninhas resistentes, o que torna-se grave problema para as áreas de produção agrícola. As plantas daninhas quando convivendo junto com as culturas interferem no seu desenvolvimento e causam perdas na produtividade e na qualidade de grãos do produto final. A espécie *Echium plantagineum* L. popularmente conhecida como flor - roxa foi introduzida no Brasil com finalidade ornamental, e por ser considerada uma espécie apta a produção de mel. Atualmente sua significância está relacionada a planta infestante, que ocorre principalmente no Sul do país onde povoa campos nativos e culturas de inverno. Atualmente há plantas que não são mais controladas pelo principal herbicida utilizado nas áreas, o metsulfurom metílico, inibidor da enzima acetolactato sintase (ALS). Com o objetivo de confirmar a resistência de *E. plantagineum* ao grupo de herbicidas pertencentes ao mecanismo ALS; avaliar se a resistência está atrelada a metabolização do herbicida, além de compreender o desenvolvimento da espécie ao longo do seu ciclo e as suas características morfoanatômicas. Foram desenvolvidos três experimentos em casa de vegetação e laboratório durante os anos de 2016 a 2018 na Universidade de Passo Fundo (UPF)/ Passo Fundo. Para avaliação da resistência dos biótipos, conduziu-se experimento em casa de vegetação a fim de realizar a curva de dose resposta de quatro herbicidas inibidores da ALS (metsulfurom - metílico, bispiribaque-sodico, piroxulam e imazetapir). Para a avaliação das propriedades enzimáticas da ALS e mecanismos de resistência não relacionados ao local de ação, o estudo subdividiu-se em dois experimentos. O primeiro para avaliar a atividade da enzima ALS na presença do herbicida imazapic e a concentração de substrato (piruvato) que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação (KM) e a velocidade máxima de reação (V_{máx}). Já o segundo correspondeu ao experimento de metabolização pelo complexo citocromo P450 monooxigenase. Avaliando os biótipos quanto a análise de crescimento, caracterização morfoanatômica e contagem de cromossomos, foram realizados três experimentos. A partir dos estudos foi possível confirmar a resistência dos biótipos a enzima ALS, onde os mesmos apresentaram resistência cruzada. Para a avaliação da atividade enzimática constatou-se que houve alteração dos parâmetros cinéticos da enzima em relação ao substrato o que por sua vez também confere resistência do biótipo R e alto nível de suscetibilidade dos biótipos S1 e S2. Quando avaliando se a resistência pode estar atrelada a metabolização o estudo mostrou que há envolvimento do complexo P450 na resistência do biótipo R. E por fim foi possível analisar que biótipos respondem

de maneira distinta quanto ao desenvolvimento sendo que os biótipos sensíveis apresentam maior desenvolvimento de parte aérea já o resistente tem maior capacidade de desenvolvimento de sistema radicular. Quanto as características morfoanatômicas e contagem cromossômica não verificou-se alterações.

Palavras-chave: 1. Flor - roxa. 2. Metabolização. 3. Atividade enzimática. 4. Caracterização morfoanatômica. 5. Análise de crescimento.

ABSTRACT

PERUZZO, Sabrina Tolotti Characterization of resistance of *Echium plantagineum* to acetolactate synthase (ALS) inhibitor herbicides / Sabrina Tolotti Peruzzo. - 2019.99 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) - University of Passo Fundo, 2019.

The high degree of genetic variability of plant populations, is one of the main features that allow the survival and adaptation of species under any environmental condition of stress caused to the environment. The continued use of a single herbicide or mechanism of action favors the selection of resistant weeds, which becomes serious problem in the areas of agricultural production. The weeds when living with the cultures interfere in their development and cause losses in productivity and quality of the final product grain. The *Echium plantagineum* L. species commonly known as flower - Purple was introduced in Brazil with an ornamental purpose, and it is considered a suitable species to produce honey. Currently its significance is related to weed plant, which occurs mainly in the south where inhabits grasslands and winter crops. Currently there are plants that are no longer controlled by the main herbicide used in areas, methyl metsulfurom, acetolactate synthase enzyme inhibitor (ALS). Aiming to confirm the resistance *E. plantagineum* the group of the ALS herbicides mechanism; assess whether the resistance is linked to the metabolism of the herbicide, as well as understanding the development of the species throughout its cycle and its characteristics morphoanatomic. Three experiments were conducted in greenhouse and laboratory during the years 2016 to 2018 at the University of Passo Fundo (UPF)/Passo Fundo. To evaluate the resistance of the biotypes experiment was conducted in a greenhouse in order to realize the dose response curve four ALS inhibitor herbicides (metsulfurom - methyl, bispyribac-sodium, and piroxulam imazethapyr). For the evaluation of enzymatic properties of ALS and resistance mechanisms unrelated to the site of action, the study-subdivided in two experiments. The first to assess the activity of the ALS enzyme in the presence of imazapic and the concentration of substrate (pyruvate) that provides initial speed equal to half the maximum reaction rate (KM) and maximum reaction velocity (Vmax). The second corresponded to the test metabolism by cytochrome P450 monooxygenase complex. Biotopes as evaluating the growth analysis, morphoanatomical chromosomes and counting were performed three experiments. From the studies it was unable to verify the resistance of the ALS enzyme biotypes, where they were cross-resistant. To assess the enzymatic activity it was found that there was a change of the kinetic parameters of the enzyme to the substrate which in turn also confers biotype resistance R and the high level of susceptibility biotypes S1 and S2. When assessing whether the resistance can be linked to metabolism study showed that there is involvement of the P450 complex in biotype resistance R. Finally parse that biotypes respond differently in the development being that sensitive biotypes have greater development of air already has tough Mays root system development capabilities. As the morphoanatomic features and chromosome counting not found to change.

Key words: 1. Purple flower. 2. Metabolization. 3. Enzymatic activity. 4. Morpho-anatomical characterization. 5. Growth analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
3	CAPÍTULO I	27
3.1	<i>Resumo</i>	27
3.2	<i>Introdução</i>	27
3.3	<i>Material e Métodos</i>	29
3.4	<i>Resultados e Discussão</i>	32
3.5	<i>Conclusão</i>	43
4	CAPÍTULO II	44
4.1	<i>Resumo</i>	44
4.2	<i>Introdução</i>	45
4.3	<i>Material e Métodos</i>	47
4.4	<i>Resultados e Discussão</i>	51
4.5	<i>Conclusões</i>	60
5	CAPÍTULO III	61
5.1	<i>Resumo</i>	61
5.2	<i>Introdução</i>	62
5.3	<i>Material e Métodos</i>	64
5.4	<i>Resultados e Discussão</i>	69
5.5	<i>Conclusões</i>	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7	CONCLUSÃO GERAL	87
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Echium plantagineum* L., popularmente conhecida como flor - roxa pertencente à família Boraginaceae, a espécie é originária da Europa, introduzida no Brasil, em especial para região Sul do país, com finalidade ornamental e por ser considerada uma espécie apta a produção de mel. Atualmente sua significância está relacionada a planta infestante, que ocorre principalmente no Sul do país infestando campos nativos e culturas de inverno.

Como principais características em seu desenvolvimento está a formação de roseta achatada de folhas sobre o solo no período de inverno. Ao final desse período desenvolvem-se caules que sustentarão seu florescimento na primavera. Suas flores são de cor púrpura a violáceas, muito atrativa à abelhas. Plantas emergidas na primavera ou verão permanecem em estágio vegetativo até o próximo inverno para então florescerem.

O elevado grau de variabilidade genética existente entre populações de plantas, infere-se que é uma das principais características que permitem a sobrevivência e adaptação das espécies em qualquer condição ambiental de estresse provocado no ambiente. O uso contínuo de um único herbicida ou mecanismo de ação favorece a seleção de plantas daninhas resistentes, o que torna-se grave problema para as áreas de produção agrícola.

Atualmente no Brasil não se tem produtos recomendados para o controle da espécie, sendo assim o herbicida metsulfurom - metílico é o mais utilizado nas áreas de cereais de inverno, devido a seu baixo custo, o que pelo seu uso contínuo acelera o surgimento de biótipos tolerantes/resistentes a ele. As plantas daninhas quando junto com as culturas interferem no seu desenvolvimento e causam perdas na produtividade e na qualidade de grãos do produto final.

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas assume importância, principalmente em razão ao limitado número de herbicidas alternativos existentes que podem ser utilizados no controle dos biótipos resistentes (AGOSTINETTO, et al., 2002). Porém, o uso em demasia de um único mecanismo acelera a seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas.

Resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) é a forma mais comum de resistência em populações de plantas daninhas em todo o mundo (WALSH et al., 2007). Isso indica a facilidade com que essa resistência é selecionada. Todavia a resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) em *E. plantagineum* pode estar relacionada a alterações de expressão nível de expressão da enzima ALS, sendo assim, *quando* biótipos resistentes e suscetíveis forem comparados quanto à organização anatômica foliar, controle, crescimento e desenvolvimento haverá mudanças entre biótipo R e S a nível de anatomia foliar, crescimento e nível de controle para os biótipos de flor-roxa.

Atualmente a principal forma empregada de manejo para controle plantas daninhas é o controle químico das mesmas. Em áreas manejadas no período de inverno observou-se controle reduzido de plantas de flor-roxa quando realizado o manejo com o herbicida metsulfurom metílico, inibidor da enzima ALS (PERUZZO, 2016). Essas plantas quando não manejadas de maneira correta prejudicam a cultura do trigo, uma vez que esse herbicida é uma das poucas alternativas para aplicações em pós – emergência da cultura.

O conhecimento do desenvolvimento e das características morfológicas e anatômicas dos biótipos resistentes e suscetíveis a herbicidas, é elemento básico na previsão das perdas de rendimento, causadas por essas espécies, visto que não basta conhecer somente o comportamento dos herbicidas. O entendimento dos fatores que influenciam a absorção dos produtos e a ação dos mesmos nesses biótipos é de extrema importância para que se consiga traçar estratégias de manejo, que visem a supressão de plantas daninhas nas áreas onde estão presentes.

Diante disso objetivou-se confirmar a resistência de *E. plantagineum* ao grupo de herbicidas pertencentes ao mecanismo ALS; avaliar se a resistência está atrelada a metabolização do herbicida, além de compreender o desenvolvimento da espécie ao longo do seu ciclo e as suas características morfoanatômicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A flor-roxa é uma espécie nativa do sul da Europa, pertencente à família Boraginaceae, comporta-se como planta anual, bienal ou semi-perene, dependendo das condições ambientais (KISSMANN, 1999). Inicialmente, a espécie foi cultivada em diferentes regiões da Europa com fins ornamentais. No Brasil, sua importância se deve ao fato de ser planta infestante, ocorrendo principalmente, no sul do país, onde povoa campos nativos e culturas de inverno.

Caracteriza-se por formar uma roseta achatada de folhas sobre o solo no período de inverno, ao final desse período, o caule alonga e o florescimento ocorre na primavera, suas flores são de cor púrpura a violáceas, muito atrativa a abelhas (KISSMANN, 1999).

Plantas emergidas na primavera ou verão permanecem em estágio vegetativo até o próximo inverno para então florescerem. Quando ocorre em lavouras de trigo a competição se dá durante todo o ciclo da cultura, reduzindo assim a produtividade, o que se deve ao fato de ocorrer disputa pelos recursos do meio (PERUZZO, 2016).

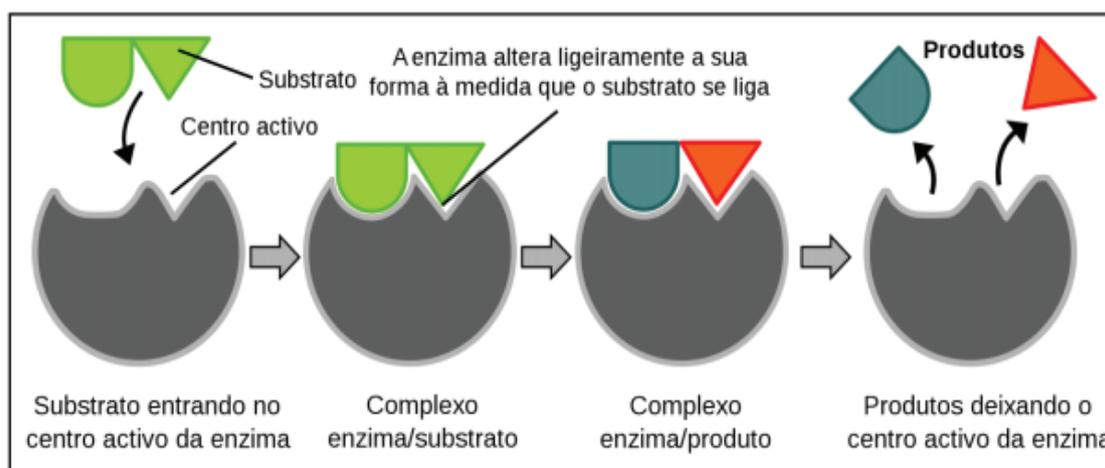
O controle químico de plantas daninhas é prática agrícola presente em todos os sistemas de produção e os herbicidas são a principal ferramenta de manejo (POWLES; YU, 2010). O controle químico é praticado intensivamente e, muitas vezes, de forma inadequada, o que agrava o problema de resistência devido à seleção de plantas daninhas resistentes aos herbicidas (MARIANI et al., 2015).

O uso contínuo de um único herbicida ou mecanismo de ação favorece a seleção de plantas daninhas resistentes, o que torna-se grave problema para as áreas de produção agrícola. O herbicida nada mais é que o agente selecionador de biótipos resistentes, por meio da pressão de seleção, não sendo o agente mutagênico responsável pelo

aparecimento dos genes mutantes que surgem na população por variabilidade genética natural (RIZZARDI et al., 2002).

A ação de um herbicida ocorre quando o mesmo apresentar eficácia, o qual pode ser ele aplicado diretamente sobre as folhas, que por sua vez devem ficar retidos, penetrar e/ou ultrapassar a cutícula e mover-se nos espaços entre as células e por fim entrar na membrana celular e atingir o local de ação, que geralmente é uma enzima, ligar-se a enzima alvo para inibi-la (ROMAN et al., 2007), a ação de ligação da enzima depende do substrato e por fim de uma perfeita harmonia para que então ocorra a ligação e atuação de suas funções (Figura 1).

Figura 1 - Diagrama que mostra a atividade enzimática através do modelo do encaixe induzido.



Fonte: Modificada Daniel Koshland, 1995 e Batista, 2016

Mesmo que os herbicidas sejam ferramentas eficazes de manejo, a dependência excessiva de um único mecanismo de ação favorece a seleção de populações resistentes (TRANEL; WRIGHT, 2002).

Em áreas manejadas no inverno observou-se controle reduzido de flor-roxa sob manejo com o herbicida metsulfurom - metílico, inibidor da enzima ALS (PERUZZO, 2016). Essas plantas, quando não manejadas de maneira correta prejudicam as culturas

uma vez que esse herbicida é uma das poucas alternativas para aplicações em pós-emergência da cultura.

A evolução das plantas daninhas resistentes se deve ao fato de que uma população de planta daninha apresenta elevado grau de variabilidade genética existente, a qual é uma das principais características que permitem a sobrevivência e adaptação das espécies em qualquer condição ambiental.

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas assume importância, principalmente em razão ao limitado número de herbicidas alternativos existentes que podem ser utilizados no controle dos biótipos resistentes (AGOSTINETTO et al., 2002). Porém, o uso em demasia de um único mecanismo facilita a evolução da resistência de plantas daninhas.

A exemplo disso encontra-se a flor-roxa, que é espécie secundária em áreas agrícolas. Porém, devido ao uso contínuo e em altas doses do herbicida metsulfurom - metílico nessas áreas para controlar outras plantas selecionou a espécie em estudo, onde evoluiu a resistência.

A resistência é um fenômeno natural que ocorre espontaneamente em populações de plantas daninhas. Porém, somente é notada quando ocorre a pressão de seleção pela aplicação de herbicidas pertencentes a um mesmo mecanismo de ação (NEVILL et al., 1998). Diante disso, a resistência de planta daninha é definida como a habilidade de uma planta sobreviver e se reproduzir, após exposição a uma dose de herbicida que normalmente era letal para o biótipo suscetível da planta (HEAP, 2019). A resistência pode ser atribuída à alteração do local de ação ou outro mecanismo que reduz a quantidade de herbicida ativo que chega até o local de ação do herbicida (MARIANI et al., 2015), dentre essas outras possibilidades de ocorrência de resistência podem ser citadas a metabolização e a compartimentalização dos herbicidas.

A resistência não pode ser confundida com tolerância de plantas daninhas aos herbicidas. Tolerância é uma característica inata de uma determinada espécie em

sobreviver a aplicações de herbicidas na dose recomendada que normalmente seria letal a outras espécies, sem alterar o crescimento e desenvolvimento (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

O grau de resistência varia entre as populações e podem ser quantificados mediante a DL50, que é a dose do herbicida (em g i.a ha⁻¹) necessária que proporciona 50% de controle ou redução do crescimento da planta daninha) (HEAP, 1994).

Como a resistência pode se caracterizar como sendo uma alteração na base genética dos indivíduos, as mutações gênicas ocorrentes estão presentes aleatoriamente em todas as populações e somente serão notadas a partir da seleção realizada pelo agente selecionador, no caso das plantas daninhas, por determinado herbicida. Todavia, essa diversidade genética é de fundamental importância para a manutenção das espécies assim como no desenvolvimento da resistência.

Qualquer população em que os indivíduos mostram base genética variável quanto à tolerância a uma medida de controle irá, com o tempo, mudar sua composição populacional como mecanismo de fuga para sobrevivência, diminuindo a sensibilidade a essa medida de controle (CHRISTOFFOLETI et al., 2000).

As características de resistência que estão presentes nas populações podem ser transmitidas a seus descendentes por sementes e pólen. Quando disseminada pelo pólen e sementes, aumenta o fluxo gênico, conferindo resistência às áreas adjacentes (MONQUEIRO et al., 2000). Em espécies alógamas há maior probabilidade de ocorrência de múltiplos mecanismos de resistência, pois a polinização cruzada permite maior recombinação gênica (CHRISTOFFOLETI; FILHO; SILVA, 1994; MONQUEIRO; CHRISTOFFOLETI; DIAS 2000).

Os biótipos resistentes a herbicidas frequentemente apresentam resistência cruzada aos herbicidas pertencentes ao mesmo grupo químico com o qual o biótipo foi selecionado, mas possuem padrões diversos de resistência cruzada a outros grupos químicos de herbicidas inibidores da ALS (MANLEY et al., 1998), por exemplo.

A enzima ALS é a primeira enzima na via de biossíntese para os amino ácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina (LEITE et al., 1998). A actividade desta enzima é regulada pela concentração final de aminoácidos e que é sensível à inibição por herbicidas inibidores de ALS (CHIPMAN et al., 1998). A enzima localiza-se nos cloroplastos de tecidos clorofilados e nos plastídios de tecidos não clorofilados, sendo sua ação mais voltada à inibição em regiões jovens da planta, com predomínio de tecidos meristemáticos e catalisa a formação de aceto-hidroxi-butirato e acetolactato sendo o local de destino de grande número de herbicidas, os quais atuam inibindo a divisão celular (POWLES; YU, 2010).

Os herbicidas comumente utilizados que inibem a rota da enzima ALS pertencem aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, triazolpirimidinas e pirimidil (tio) benzoatos. Os herbicidas pertencentes a esse mecanismo ligam-se fortemente à enzima acetolactato sintase, bloqueando o acesso para o seu local ativo (PANG et al., 2003), o que gera uma inibição não-competitiva pelo local de ação. Os herbicidas inibidores da ALS são essenciais para uma variedade de culturas devido à sua seletividade, a eficiência em baixa dosagem, reduzida toxicidade para os animais e elevado potencial para a inibição da enzima ALS (SHIMIZU et al., 2013). Todavia o uso contínuo por longo período aumenta a possibilidade de ocorrência de plantas se tornarem resistentes a tal mecanismo.

A frequência de mutação da resistência inicial para herbicidas inibidores da enzima ALS em plantas daninhas é de 10^{-6} ou inferior, e o primeiro biótipo resistente pode surgir com cinco anos ou após o início do uso intensivo desse grupo químico (SAARI et al., 1994). Dessa forma, a resistência se desenvolve de forma rápida aos herbicidas inibidores de ALS (WALSH et al., 2001).

A resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS é a forma mais comum de resistência em populações de plantas daninhas (WALSH et al., 2007). Isso indica a facilidade com que essa resistência é selecionada. A evolução da resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da enzima ALS tornou-se uma preocupação mundial,

pois tal mecanismo apresenta o maior número de casos em comparação com outros mecanismos de ação (HEAP, 2019; MARIANI 2019).

Inúmeros casos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS já foram documentados. Tanto em nível mundial, quanto no Brasil, os herbicidas inibidores de ALS estão em primeiro lugar no quesito resistência de plantas daninhas, pois estão relatados 161 e 29 casos de resistência a ALS no mundo e no Brasil respectivamente (HEAP, 2019). No Brasil, o primeiro relato de resistência a herbicidas inibidores da enzima ALS ocorreu com picão-preto (*Bidens pilosa* L), em 1993. Já, os casos mais recentes relatos foram em 2018 para as espécies *Oryza sativa var. sylvatica*, *Galinsoga parviflora*, *Conyza canadensis* (HEAP, 2019). Para a flor-roxa, há relato de biótipo resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS na Austrália, documentado em 1997 (PRESTON, 2006).

Herbicidas inibidores da enzima ALS são utilizados, com frequência, para controlar plantas daninhas em lavouras de inverno (MARCHIORO; FRANCO, 2010). O herbicida mais utilizado para controle de plantas daninhas em conjunto com culturas de inverno, que inclui a flor-roxa, é o metsulfurom- metílico. Seu uso se deve à reduzida toxicidade que apresenta aos mamíferos, ampla seletividade às culturas e elevada eficácia em baixas doses (YU et al., 2003).

Existe elevado número de herbicidas comerciais inibidores da ALS, o que é indicativo da importância para o controle de plantas daninhas em grande número de culturas (SHANER, 1999). Todavia, o uso contínuo de um único mecanismo ou grupo químico, em uma mesma área durante vários anos consecutivos, aumenta a probabilidade de selecionar biótipos resistentes a tal mecanismo de ação. O agricultor, muitas vezes, usa apenas um herbicida durante várias safras agrícolas (POWLES; YU, 2010), o que favorece a seleção de novos biótipos resistentes.

A enzima ALS representa o mecanismo com o maior número de herbicidas para utilização no mercado (DEVINE; SHUKLA, 2000). Mecanismos de resistência ALS em

plantas incluem a redução de translocação de herbicidas, que se deve a um metabolismo melhorado do herbicida na folha tratada, ou a uma alteração local alvo (RIAR et al. 2013).

A maioria dos casos de resistência de plantas daninhas aos inibidores da enzima ALS ocorre devido à alteração do local de ação do herbicida (KAUNDUN et al., 2012). A substituição de um aminoácido muda a conformação da enzima impedindo ou mesmo limitando a ligação do herbicida (DUGGLEBY et al., 2008). A maioria dos estudos têm mostrado que não há nenhuma mudança na afinidade (K_m) da enzima para o substrato no biótipos resistentes, mas estudos têm mostrado que não há nenhuma mudança na afinidade (K_m) da enzima para o substrato no biótipos resistentes, mas estudos têm mostrado que não há nenhuma mudança na afinidade (K_m) da enzima para o substrato no biótipos resistentes, mas alteram a sensibilidade da enzima ALS à inibição dos aminoácidos de cadeia ramificada, resultando na sua acumulação (ASHIGH e TARDIF, 2007). Diante disso, a dose de herbicida necessária para inibir a atividade da enzima em biótipos resistentes é superior comparada aos biótipos suscetíveis, sendo a intensidade da inibição dependente do tipo de alteração que ocorre no gene (YU et al., 2012).

Outra possibilidade de ocorrência está relacionado aos mecanismos de resistência que não estão relacionados ao local alvo de ação da enzima, onde a resistência pode ocorrer devido ao aumento do metabolismo e compartimentalização, uma redução na absorção ou o diferencial translocação do herbicida molécula (POWLES e YU, 2010; DÉLYE et al., 2013). Estes mecanismos de resistência também caracterizam-se por taxas maiores de desintoxicação herbicida devido ao aumento da glutathione-S- transferase, atividade do citocromo P 450 e da glicosiltransferase ou monooxigenase (DÉLYE et al., 2013). No entanto, ambos os mecanismos podem afetar a eficácia do herbicida, diante disso deve ser avaliado à possibilidade da sua coexistência (AHMAD-HAMDANI et al., 2013, BROSANAN et al., 2016).

A atividade catalítica da enzima ALS é regulada pela concentração final de produtos de biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (DUGGLEBY et al., 2008). No entanto, a sensibilidade da enzima na regulação enzimática pode ser influenciada também por mutações que ocorrem em plantas que são resistentes ao inibidor

da enzima ALS (DUGGLEBY e PANG, 2000). Insensibilidade por inibição através de uma realimentação de alguns ou de todos os três aminoácidos pode ser afetada pelo tipo de substituição que dá resistência (EBERLEIN et al., 1997). Como consequência, esta alteração na concentração de aminoácidos podem alterar o metabolismo durante o seu ciclo de vida da planta (ASHIGH e TARDIF, 2007), bem como representando um custo de adaptação, que mantém os alelos mutantes a baixas frequências em populações não tratadas (PRESTON et al., 2006).

Outra característica dos biótipos que apresentam resistência à enzima ALS é que eles não são resistentes a um único grupo químico, mas sim apresentam resistência a mais de um grupo químico pertencente ao mesmo mecanismo (MARIANI et al., 2015). Portanto, a elucidação do mecanismo de resistência é importante para a determinação estratégias e para a redução da pressão seletiva de resistência de plantas daninhas aos herbicidas (CECHIN et al., 2017).

Em trabalhos realizados com *Cyperus difformis* observou-se que a resistência aos herbicidas inibidores da ALS decorreu da insensibilidade da enzima ao herbicida, porém sem alterar os parâmetros cinéticos da enzima (DAL MAGRO et al., 2010). Alterações no local de ação geralmente são provenientes de mutações a nível de genes que codificam a enzima (DEVINE; SHUKLA, 2000) e que resultam em menor afinidade da enzima com os inibidores, porém com ausência ou reduzida perda da função enzimática (TRANEL; WRIGHT, 2002).

O impacto da mutação que causa resistência aos inibidores da enzima ALS depende do ponto da mutação e da espécie envolvida, o que pode conferir maior efeito no crescimento de plantas e competitividade (TARDIF et al., 2006) ou, então, não representar nenhum efeito (LI et al., 2013).

Em estudos moleculares, para averiguar as possíveis mudanças na base genética de populações resistentes de nabo (*Raphanus raphanistrum*) à enzima ALS, observou-se que a mudança mais comum ocorreu na posição do aminoácido 197 da enzima, que em plantas suscetíveis é prolina, já para a população resistente foi alterada para qualquer um

dos aminoácidos histidina, serina, treonina ou alanina (YU et al., 2003). McCullough et al. (2016), avaliando a base genética de populações resistente e suscetível de (*Cyperus compressus*) observaram mudanças na posição 197 do aminoácido prolina para serina.

Uma alternativa para evitar que ocorram mais mutações a nível de DNA é realizar a rotação de mecanismos de ação, para controlar as plantas daninhas. Isso tem o intuito de retirar a pressão de seleção de um único mecanismo de ação, como no caso do ALS. Todavia, para que essa alternativa perdure por mais tempo, é necessário integrar outras medidas preventivas, como as culturais, físicas e mecânicas.

Conforme Morrison; Bourgeois (1995), o manejo sustentável da resistência ou “Manejo inteligente de plantas daninhas” é aquele que adota uma série de medidas, como: culturas mais competitivas através da seleção de cultivares e espaçamento adequado entre linhas, emergência rápida e uniforme pelo uso de sementes com procedência idônea, rotação de culturas para influenciar na quebra de sucessão de plantas daninhas e rotação de mecanismo de ação herbicida.

Porém, para que essas medidas sejam realmente eficientes na prevenção da resistência e que possam ser recomendadas como alternativas para controle dessas plantas daninhas é necessário que se conheça o comportamento biológico tanto do biótipo suscetível quanto ao resistente.

Com a evolução de populações de difícil controle, o valor adaptativo de alelos resistentes pode ser acompanhado da existência de custos de adaptação e esses efeitos pleiotrópicos podem ser negativos ou positivos em dado ambiente, dependendo do alelo relacionado (DÉLYE et al., 2013).

Uma das formas de avaliar qual biótipo resistente (R) ou suscetível (S) é mais competitivo é por meio da análise de crescimento, que leva em consideração o desenvolvimento das plantas. Nas recomendações das estratégias de prevenção e manejo da resistência de plantas daninhas aos herbicidas, é fundamental que sejam conhecidas a

competitividade e adaptabilidade dos biótipos em estudos (CHRISTOFFOLETI e OVEJERO, 2003).

A caracterização de biótipos R e S aos inibidores da enzima ALS é importante para a compreensão do seu comportamento no ambiente, assim como para avaliar a sua capacidade de competição com a cultura e para propor práticas de manejo que reduzam a evolução da resistência (MARIANI, et al., 2016).

3 CAPÍTULO I

Resistência de biótipos de *Echium plantagineum* L. a herbicidas inibidores da enzima Acetolactato Sintase (ALS/AHAS)

3.1 Resumo

Echium plantagineum (EHIPL) é uma planta que ocorre no Sul do Brasil, onde inicialmente povoava campos nativos, posteriormente passou a ser observada nas culturas de inverno e migrar para diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Atualmente apresenta dificuldade para ser controlada com os herbicidas inibidores da ALS. Objetivou-se avaliar a resposta de distintos biótipos de flor-roxa quando submetidos a diferentes grupos químicos de herbicidas inibidores da enzima ALS. Realizou-se um experimento em casa de vegetação, em esquema fatorial 3x10 e quatro repetições, com a combinação de três biótipos de EHIPL (resistente, suscetível 1 e suscetível 2), os quais corresponderam ao fator A, e quatro herbicidas (metsulfurom - metílico, bispiribaque-sódico, piroxulam e imazetapir, com dez doses múltiplas de cada herbicida sendo elas (0 D; 0,25 D; 0,50 D; 1 D; 2 D; 4 D; 8 D; 16 D; 32 D; 64 D), que representam o fator B, em que D é a dose mais utilizada para o controle de plantas daninhas na cultura do trigo ou em outra espécie liliopsida. As doses mais comumente utilizadas para os herbicidas metsulfurom - metílico, bispiribaque sódico, piroxulam e imazetapir foram 2,4; 50; 18 e 106 g ia ha⁻¹ respectivamente. Avaliou-se, visualmente, o controle do biótipos aos 14 e 35 dias após aplicação (DAA) dos herbicidas e nos mesmos períodos realizou-se a massa seca, onde foram retiradas três plantas de cada vaso em sua respectiva época. Os resultados de controle, MS inicialmente foram submetidos à análise de variância e quando significativos ($p < 0,05$) empregou-se análise de regressão, utilizando modelos não lineares de ajuste de curva de dose resposta. Verificou-se que os biótipos apresentam diferenças em relação ao seu controle ao longo das avaliações. Porém ao término do experimento foi possível concluir que o biótipo R de flor - roxa possui resistência cruzada aos herbicidas de diferentes grupos químicos dos inibidores da ALS.

Palavras-chave: 1. Controle. 2. Flor-rxa. 3. Herbicidas. 4. Planta daninha. 5. Resistência cruzada.

3.2 Introdução

Atualmente no mundo são encontrados 499 casos de resistência, onde encontram-se 255 espécies resistentes, sendo 148 com plantas dicotiledôneas e 107

monocotiledôneas, as plantas daninhas desenvolveram resistência a 23 dos 26 locais conhecidos de ação de herbicidas e a 167 herbicidas diferentes (HEAP, 2019). Sabe-se que o maior número casos de plantas daninhas resistentes estão ligados aos herbicidas pertencentes aos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), com 161 casos a nível mundial. No Brasil, são encontrados 50 casos de resistência e desses, 29 estão relacionados a enzima ALS (HEAP, 2019).

A seleção de plantas daninhas resistentes caracteriza-se por ser uma evolução dos fatores genéticos e da fenologia das espécies (DARMENCY et al., 2017), o qual nada mais é do que uma resposta evolutiva das espécies ao uso contínuo de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação durante vários anos consecutivos (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2001). Isso assume importância, em razão do limitado número de herbicidas alternativos que são utilizados para o controle dos biótipos resistentes. O aumento da resistência está condicionado a fatores que relacionam-se as características das plantas, dos herbicidas, por acima de tudo aos manejos empregados para controlar plantas daninhas presentes em áreas agrícolas (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2003).

Pois devido ao uso errôneo dos herbicidas (épocas de desenvolvimento das plantas daninhas e doses abaixo ou acima do recomendado), favorecem a seleção mais precoce da resistência. O que inúmeras vezes pode contribuir por diminuir a vida útil dos produtos no mercado, além de agravar cada vez mais os casos de resistência.

Echium plantagineum (EHIPL) é uma planta que ocorre no Sul do Brasil, onde inicialmente povoava campos nativos, posteriormente passou a ser observada nas culturas de inverno e migrar para diferentes regiões do Rio Grande do Sul (PERUZZO, 2016). Atualmente apresenta dificuldade para ser controlada com os herbicidas inibidores da ALS. Entre os herbicidas utilizados para o seu controle no período de inverno no Sul do país destaca-se o herbicida metsulfurom metílico. Em determinadas áreas, plantas de EHIPL estão apresentando dificuldade de controle com tal herbicida, essas plantas quando não controladas causam prejuízos e dificultam o manejo das culturas.

Em trabalho já realizado na Austrália, constatou-se a resistência de EHIPL ao herbicida metsulfurom - metílico, assim como a demais herbicidas pertencentes a inibidores da enzima ALS testados. No mesmo estudo avaliando-se a atividade enzimática in vivo dos biótipos, constatou-se que os mesmos eram altamente resistente (Fator $F > 30$), a todos os herbicidas sulfonilureias e baixa resistência aos herbicidas imidazolinonas (PRESTON, 2006).

Diante disso, objetivou-se avaliar a resposta de distintos biótipos de flor-roxa quando submetidos a diferentes grupos químicos de herbicidas inibidores da enzima ALS.

3.3 Material e Métodos

No ano 2013, sementes de EHIPL com suspeita de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, foram coletadas em áreas onde ocorreram falhas de controle, no município de Tupanciretã, RS. Após a coleta, as sementes foram semeadas em vasos plásticos, em Passo Fundo, RS, e, posteriormente, quando atingiram três a quatro folhas verdadeiras, realizou-se a pré-seleção de biótipos resistentes, com aplicação de 2,4 g i.a ha⁻¹ de metsulfurom-metílico (Ally[®]). As plantas que sobreviveram ao tratamento herbicida foram conduzidas até o final do ciclo, para obtenção de sementes, constituindo, assim, a população suspeita de resistência (Biótipo R). Para as populações suscetíveis (Biótipo S1 e S2), coletaram-se plantas de EHIPL, em 2014 e 2015, nos municípios de Ronda Alta, RS e Constantina, RS, respectivamente. Em ambas as populações suscetíveis não havia histórico de aplicação de herbicidas inibidores de ALS. Posteriormente, as sementes dessas plantas foram semeadas para compor a população sensível.

O experimento foi desenvolvido no período de maio a julho de 2017, em casa – de - vegetação. 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 m², preenchidos com substrato comercial do tipo Turfa Fértil[®]. Em maio de 2017 semearam-se sementes dos biótipos resistente (R), suscetível (S1) e suscetível (S2) sendo os vasos mantidos em casa de vegetação com irrigação intermitente. Após 15 dias da semeadura, realizou-se o desbaste, mantendo seis plantas

por vaso. Quando no estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas verdadeiras, os vasos foram retirados da casa de vegetação para aplicação dos herbicidas. 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⁻¹. Após a aplicação dos herbicidas, 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 resultaram da combinação de três biótipos de EHIPL (resistente, suscetível 1 e suscetível 2), e quatro herbicidas (metsulfurom - metílico (2,4 g ia ha⁻¹), bispiribaque-sódico (400 g ia ha⁻¹), piroxulam (45 g ia ha⁻¹) e imazetapir (106 g ia ha⁻¹), com dez doses múltiplas de cada herbicida sendo elas (0 D; 0,25 D; 0,50 D; 1 D; 2 D; 4 D; 8 D; 16 D; 32 D; 64 D), em que D é a dose mais utilizada para o controle de plantas daninhas na cultura do trigo ou em outra espécie liliopsida. Assim as doses mais comumente utilizadas para os herbicidas metsulfurom - metílico, bispiribaque sódico, piroxulam e imazetapir foram 2,4; 50; 18 e 106 g ia ha⁻¹ respectivamente. O experimento foi arranjado em esquema fatorial 3 x 10, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O fator A foi constituído pelos biótipos R, S1 e S2, e o fator B pelos herbicidas e suas respectivas doses comerciais, sendo que foram utilizadas sementes de uma única planta do biótipo R do biótipo S1 e S2 para realizar o experimento. A posição dos vasos foi alterada periodicamente, a fim de obter condições experimentais homogêneas.

Avaliou-se, visualmente, o controle do biótipos aos 14 e 35 dias após aplicação (DAA) dos herbicidas, 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 do vaso. Avaliações de massa seca (MS) foram realizadas, retirando-se três plantas por vaso aos 14 DAA e mais três plantas aos 35 DAA e, posteriormente, secas em estufa a 65°C por 72 horas até obter peso constante, quando foi realizada a quantificação da MS em balança de precisão.

Os valores de MS foram transformados para percentuais, partindo-se do princípio de que as parcelas que permaneceram sem aplicação de herbicida possuíam 100% de MS

e as demais possuíam percentuais desta biomassa, em consequência da redução imposta pelos herbicidas (BECKIE et al., 2012). Os resultados de controle, MS inicialmente foram submetidos à análise de variância e quando significativos ($p < 0,05$) empregou-se análise de regressão, utilizando modelos não lineares de ajuste de curva de dose resposta. Para esse tipo de experimento a resistência confirma-se quando houver diferença estatística na resposta do herbicida entre os biótipos R, S e S2 e comprovados por modelos de regressão não linear (BRAIN; COUSENS, 1989).

Para o ajuste da curva dos dados de controle, MS e redução de porte utilizou-se o modelo exponencial de declínio duplo de quatro parâmetros proposto por BECKIE et al., 2012.

Equação 1:

$$Y = a e^{(-b \cdot x)} + c e^{(-d \cdot x)} \text{ onde:}$$

Y= % de controle;

x= é o coeficiente de dose do herbicida (g i.a.ha^{-1});

a= limite inferior;

a+c= limite superior; e

b e d= quantificam a inclinação da curva.

A fim de comparar as respostas, calculou-se, com base nas equações de ajuste da curva, a dose que controla 50% (DL50) das populações R, S e S2 ou a porcentagem de redução na produção de massa seca em relação à testemunha (DL50). Considerando-se esses valores, determinou-se o fator de resistência (FR), que representa o número de vezes em que a dose necessária que proporcionar 50% de controle ou de redução na produção

de massa seca do biótipo suscetível deve ser aumentada, para que possa ocorrer o mesmo efeito sobre o resistente (GAZZIERO et al., 1998).

3.4 Resultados e Discussão

Através da análise de variância é possível constatar interação significativa entre biótipos e doses dos herbicidas utilizados para controle e massa seca, aos 14 e 35 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos.

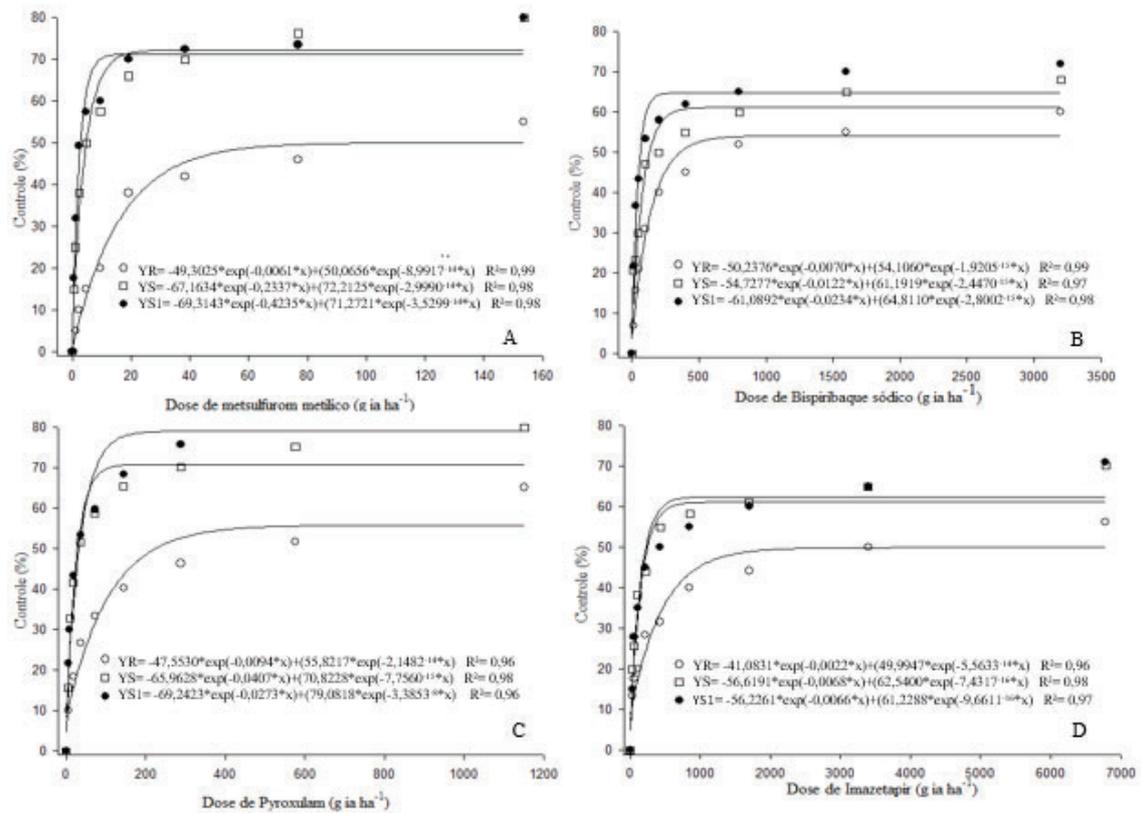
O controle obtido com os herbicidas variaram de acordo com o biótipo avaliado para ambas as épocas estudadas (Figuras 2 e 3). Aos 14 DAA é possível observar em todos os tratamentos herbicidas que a resposta de controle entre os biótipos foi similar, biótipo R apresentando menor controle do que os biótipos S1 e S2 (Figura 1). Ainda é possível observar que com o aumento de dose em todos os herbicidas utilizados o controle para os biótipos S1 e S2 elevou-se.

Aos 14 DAA o nível de controle dos biótipos R, S1 e S2 com dose recomendada de 2,4 g ia. ha⁻¹ de metsulfurom metílico foi de 13 e 18%, para os biótipos suscetíveis respectivamente. Nesta fase para chegar a o controle mínimo de 80% seriam necessárias doses acima de 153 g ia ha⁻¹ para todos os biótipos estudados. (Figura 2A). Para o herbicida bispiribaque sódico o controle do biótipo S2 foi o mais elevado na escala percentual ultrapassando os 50% de controle na dose de 60,58 g ia.ha⁻¹, já para o biótipo S e R o controle chegou a 21 e 35% respectivamente na mesma dose que para o biótipo S2 (Figura 2 B).

Observa-se que piroxulam e imazetapir apresentaram resposta semelhante aos anteriores, onde aproximaram-se mais do controle com o herbicida metsulfurom-metílico. Para ambos os herbicidas, nas doses de 18 e 106 g ia ha⁻¹, respectivamente, o controle para os biótipos R, S1 e S2 variou de 15 a 39% e 17 a 35% para imazetapir (Figuras 2C e 2D). Esse efeito do baixo nível de controle para o biótipo R aos 14 DAA já dá indicio de uma possível resistência cruzada aos herbicidas inibidores da enzima ALS.

E mesmo os biótipos S1 e S2 sendo originários de locais distintos, a resposta para ambos mostra-se muito semelhante.

Figura 2 - Controle aos 14 dias após a aplicação (DAA) dos biótipos Resistente (○), suscetível 1 (□) e suscetível 2 (●). A= metsulfurom metílico, B= bispiribaque sódico, C= piroxulam e D= imazetapir



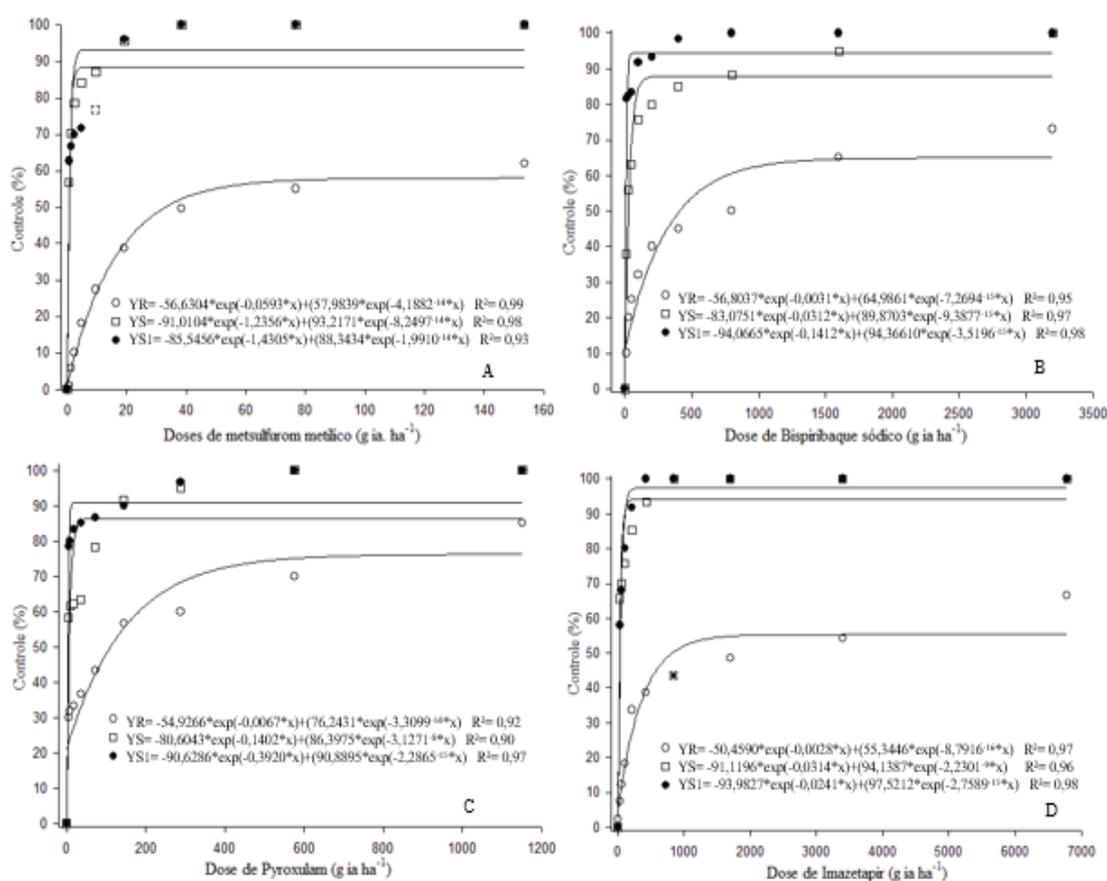
Fonte: Dados do autor

De acordo com estudos realizados por Tranel e Wright (2002), herbicidas inibidores da ALS têm a característica de alta eficácia, quando utilizados em doses comerciais de biótipos sensíveis. Porém mesmo que esses herbicidas controlem de maneira eficiente os biótipos sensíveis é importante não depender de alguns ou exclusivamente um ou mais herbicidas pertencentes a um único mecanismo de, pois a evolução da resistência pode se dar rapidamente (WALSH et al., 2006).

Aos 35 DAA observa-se resposta semelhante a aquelas encontradas aos 14 DAA para todos os herbicidas. De modo geral, o controle do biótipo R chegou a

aproximadamente 60% para todos os herbicidas testados, já o controle dos biótipos S e S2 o controle ficou muito próximo a 100% (Figura 3).

Figura 3 - Controle aos 35 dias após a aplicação (DAA) dos biótipos Resistente (○), suscetível 1 (□) e suscetível 2 (●). A= metsulfurom metílico, B= bispiribaque sódico, C= piroxulam e D= imazetapir. Passo Fundo, 2018



Fonte: Dados do Autor

Para o herbicida metsulfurom- metílico o controle para o biótipo R variou de 1,35 na menor dose de produto chegando a 58% maior dose (153,2 g ia ha⁻¹), já para os biótipos S1 e S2 nas doses de 2,4 e 153,2 g ia ha⁻¹ o controle variou de 88 e 86% e 93, 90% respectivamente (Figura 3 A). Para o herbicida bispiribaque sódico pertencente ao grupo químico do ácido Pirimidiniloxibenzoico o controle para o biótipo R não superou a 64% na dose de 3200 g ia ha⁻¹, já para os biótipos S e S2 o controle na mesma dose foi de 90 e 94 % respectivamente (Figura 3 B).

Avaliando-se a resposta apresentada pelo herbicida piroxulam para os biótipos R, S1 e S2 é possível observar que na dose de 18 g ia ha⁻¹, comumente utilizada a campo, o controle para os biótipos S1 e S2 já superou 50% e para o biótipo R o mesmo controle foi alcançado utilizando-se aproximadamente 6 vezes a dose de 18 g ia ha⁻¹. Isso dá claros indícios de que os biótipos são resistentes aos inibidores da enzima ALS. O controle aos 35 DAA não atingiu 100% para os biótipos S1 e S2 devido ao fato de as plantas ainda apresentarem pontuações esverdeadas principalmente nos pecíolos das folhas, porém na base das folhas as mesmas já estavam totalmente necrosadas, o que ocorreu de forma diferente para o biótipo R, pois nesse caso as plantas apresentavam rebrotes, os quais se caracterizaram por calos com pequenas brotações.

Para o herbicida imazetapir o controle para o biótipo R, aos 35 DAA, não superou 60% de controle na dose mais alta (6784 g ia ha⁻¹) utilizada, já para os biótipos S1 e S2 o controle chegou a aproximadamente 100 % na dose mais alta para ambos os biótipos S1 e S2 (Figura 3 D). A resposta de controle diferente entre os herbicidas pertencentes ao mesmo mecanismo de ação pode estar associado não somente as diferenças biológicas existentes entre os biótipos, mas também devido ao período de ação que cada produto leva para expressar os sintomas nas plantas.

A partir das equações que encontram-se nas figuras 2 e 3 foi possível calcular a dose letal que controla 50% dos biótipos (DL 50), a qual é calculada a partir dos dados gerados para as curvas, e o Fator F (Tabela 1). Aos 14 DAA observa-se que os biótipos e principalmente os herbicidas diferiram para o fator F e (Tabela 1). Observa-se que para todos os herbicidas testados o fator F encontrado para os biótipos testados ficou acima de 10, o que por sua vez caracteriza resistência dos mesmos, exceto para os herbicidas bispiribaque sódico e piroxulam onde o Fator F encontrado foi de 2,95 e 6,76 para bispiribaque e de 8,08 e 7,16 para piroxulam, neste caso não caracteriza resistência dos biótipos para o herbicida (Tabela 1). Ao trabalharem com *Polygonum convolvulus* L., Beckie et al., (2012) observaram que a população R foi altamente resistente, pois apresentou Fator F > 10. Da mesma forma no presente estudo pode-se afirmar que para os herbicidas metsulfurom - metílico e imazetapir aos 14 DAA é possível comprovar a resistencia do biótipo R. O mesmo para o herbicida metsulfurom metílico foi observado

em trabalho realizado no ano de 2016, onde o biótipo R aos 14 DAA, apresentou fator F superior a 10 (PERUZZO, 2016).

Aos 35 DAA a dose necessária para controlar 50% das populações sensíveis de flor-roxa foi superior a aquelas relatadas aos 14 DAA para todos os herbicidas (Tabela 1). Comparando-se as duas épocas observou-se que o fator F para todos os herbicidas foi superior a 18 para todos os herbicidas estudados, o que por sua vez confirma a resistência dos biótipos R aos herbicidas inibidores da enzima ALS.

Tabela 1 - Dose necessária para controlar 50% das plantas em relação as plantas não tratadas (DL50) e fator de resistência (F) dos biótipos resistente (R), suscetível 1 (S1) e suscetível 2 (S2) de *Echium plantagineum* aos 14 e 35 dias após aplicação (DAA) dos herbicidas metsulfurom - metílico, bispiribaque sódico, pyroxulam e imazetapir. FAMV-UPF, Passo Fundo, RS, 2018

Metsulfurom – metílico			
Biótipo	Época	DL 50	Fator F
R		108,600	
S1	14	4,735	22,94
S2		2,790	38,92
R		33,850	
S1	35	0,603	56,14
S2		0,569	59,49
Bispiribaque sódico			
R		409,250	
S1	14	138,800	2,95
S2		60,580	6,76
R		430,000	
S1	35	23,695	18,15
S2		5,330	80,66
Piroxulam			
R	14	228,860	

S1		28,340	8,08
S2		31,965	7,16
<hr/>			
R		110,315	
S1	35	5,682	19,41
S2		2,031	54,32
<hr/>			
Imazetapir			
<hr/>			
R		5700,000	
S1	14	221,750	25,70
S2		244,150	23,35
<hr/>			
R		802,360	
S1	35	24,308	33,01
S2		28,300	28,34
<hr/>			

Fonte: Dados do Autor

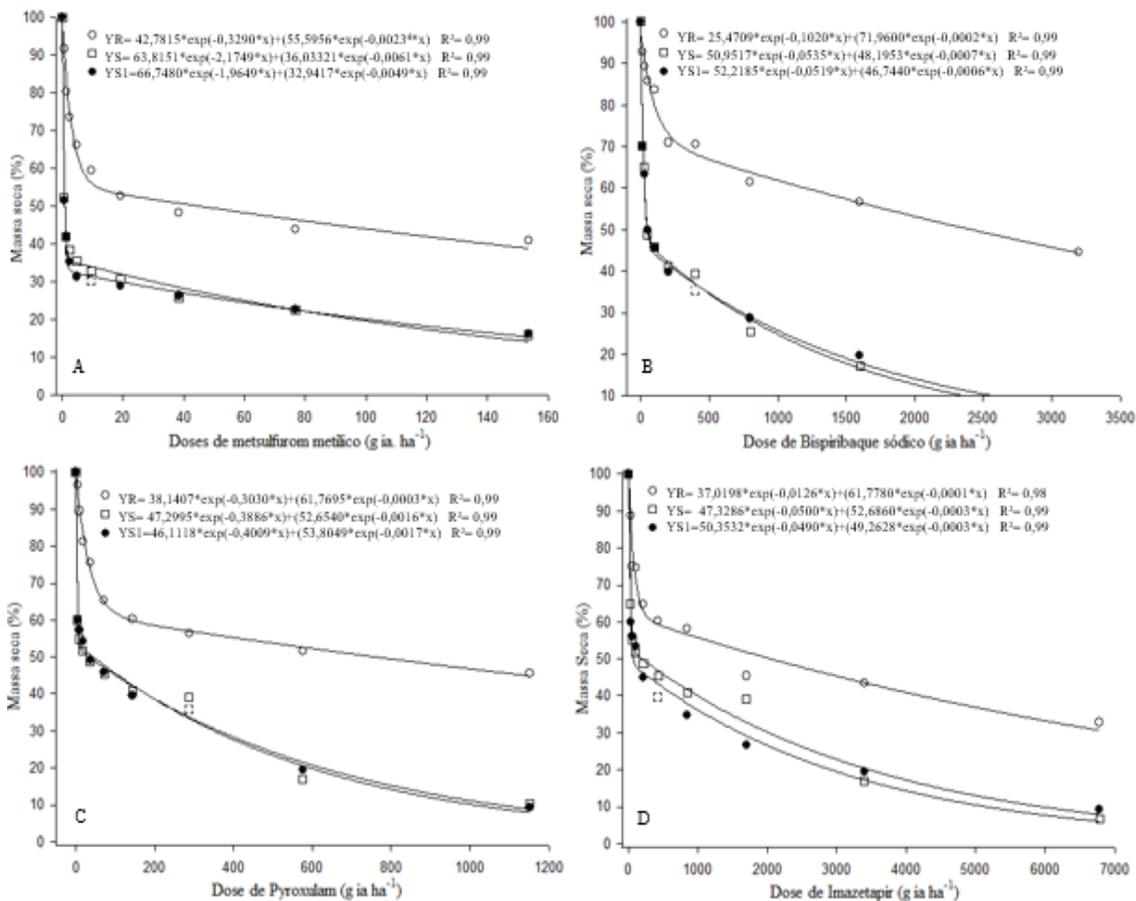
O controle lento da planta daninha está associado ao fato de que o herbicida metsulfurom - metílico apresenta ação sistêmica e por sua vez o controle é lento. Normalmente começa a ser expressivo após 14 dias de aplicação, pois os herbicidas inibidores da ALS agem na interrupção da síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, matando a planta pela falta de proteínas nas células, agindo nos tecidos jovens, portanto, possuem ação lenta de controle (SHANER, 1999). Vale ressaltar que a ação dos herbicidas varia muito conforme as condições ambientais. Em dias mais frios logo após a aplicação as plantas daninhas ficam com seu metabolismo reduzido e conseqüentemente os herbicidas demoram mais para atuar. Isso pode ter sido o que ocorreu para os herbicidas bispiribaque e piroxulam não apresentarem fator F maior que 10 aos 14 dias e após aos 35 DAA esse fator ter se elevado consideravelmente, em especial para o biótipo S2.

A diferença observada para o fator F entre os biótipos está atrelada a variabilidade genética existentes nas populações, a qual por sua vez pode ser afetada por fatores evolutivos, tais como a interação entre plantas e ambiente, o fluxo de genes através do

pólen e dispersão de sementes, a distribuição geográfica e a seleção natural (HUANGFU et al., 2009). Assim, as diferenças observadas pode ser devido a características genéticas entre os acessos, as quais por sua vez possivelmente influenciam as suas respostas ao herbicida (BONOW et al., 2018). A constituição genética de uma espécie pode determinar diferentes graus de resistência ou suscetibilidade de biótipos a herbicidas (HARTWING et al., 2008).

Avaliando-se a MS dos biótipos aos 14 e 35 DAA é possível perceber que as respostas de MS seguem a mesma tendência do que aquelas observadas para o controle de todos os biótipos (Figuras 4 e 5). De modo geral, o biótipo R foi o que apresentou menor redução de massa seca ao longo do experimento, já os biótipos S1 e S2 chegaram a reduzir aproximadamente 100% da massa seca em todos os tratamentos (Figuras 4 e 5). Essa redução não foi de 100% uma vez que com 35 DAA ainda haviam folhas que não haviam sido decompostas totalmente (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Massa seca 14 dias após a aplicação (DAA) dos biótipos Resistente (○), suscetível 1 (□) e suscetível 2 (●). A= metsulfurom - metílico, B= bispiribaque sódico, C= piroxulam e D= imazetapir. Passo Fundo, 2018



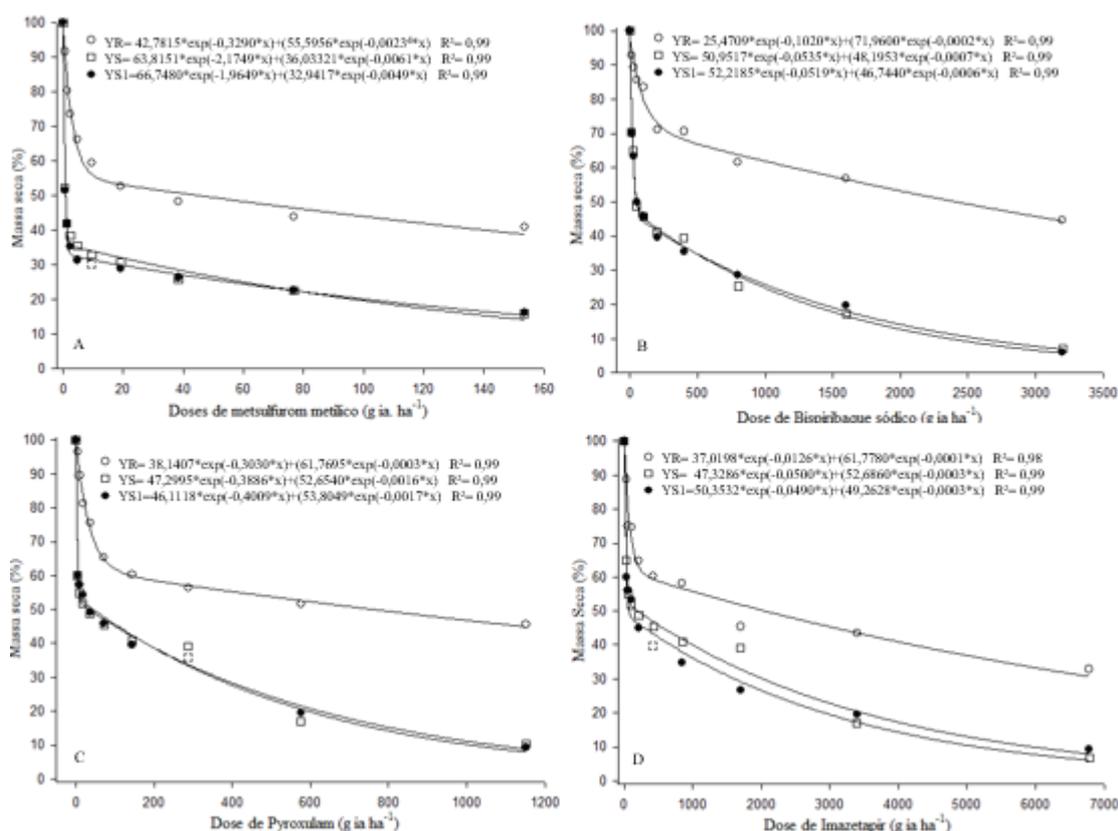
Fonte: Dados do Autor

Com os dados de massa seca observa-se que para o herbicida bispirbaque sódico a redução para os biótipos S1 e S2 foi mais significativa do que para os demais herbicidas (Figura 5 B). Já para os tratamentos herbicidas de piroxulam e imazetapir nas doses mais elevadas (1152 e 6784 g ia ha⁻¹) a redução para os biótipos S1 e S2 ficou na casa de 90% (Figuras 5 C e 5 D). Isso se deve ao fato de que ao final do experimento as folhas das plantas ainda não haviam sido decompostas totalmente.

Aos 35 DAA, observa-se em todos os tratamentos herbicidas redução em torno de 90% a massa seca dos biótipos S1 e S2, exceto para o tratamento herbicida de metsulfurom, onde a redução de massa seca ficou na casa de 85%. Isso pode estar atrelado ao fato do herbicida metsulfurom ser o mais utilizado para controle de plantas daninhas nos cereais de inverno. Sendo assim, a exposição da planta ao uso mais frequente a um

determinado produto acaba por favorecer a adaptação das plantas perante ao uso de determinado herbicida.

Figura 5 - Massa seca 35 dias após a aplicação (DAA) dos biótipos Resistente (○), suscetível 1 (□) e suscetível 2 (●). A= metsulfurom - metílico, B= bispiribaque sódico, C= piroxulam e D= imazetapir. Passo Fundo, 2018



Fonte: Dados do Autor

Com os dados obtidos nas curvas de massa seca aos 14 e 35 DAA calculou-se a dose necessária para controlar 50% da população das plantas tratadas em relação as não tratadas para todos os herbicidas utilizados (Tabela 2). Constatou-se para todos os herbicidas testados fator F superior a 10, o que por sua vez indica a resistência da flor - roxa aos diferentes grupos químicos dos herbicidas pertencentes ao mecanismo ALS.

Aos 35 DAA foi possível perceber que o fator F elevou-se em relação aos 14 DAA, para os herbicidas bispiribaque sódico e piroxulam, esse em especial com números elevados (Tabela 2). Já para os herbicidas metsulfurom - metílico e imazetapir o fator F

aos 35 DAA foi inferior a aquele observado aos 14 DAA, porém mesmo assim os fatores são elevados e comprovam a resistência dos biótipos aos herbicidas.

Tabela 2 - Dose necessária para controlar 50% das plantas tratadas em relação as plantas não tratadas (DL50) e fator de resistência (F) dos biótipos resistente (R), suscetível 1 (S1) e suscetível 2 (S2) de *Echium plantagineum* aos 14 e 35 dias após aplicação (DAA) dos herbicidas metsulfurom metílico, bispiribaque sódico, pyroxulam e imazetapir. FAMV-UPF, Passo Fundo, RS, 2018

Metsulfurom metílico			
Biótipo	Época	DL 50	Fator F
R		43,103	
S1	14	0,693	62,20
S2		0,691	63,38
R		60,408	
S1	35	1,071	56,40
S2		1,051	57,48
Bispiribaque sódico			
R		1820,000	
S1	14	50,178	32,27
S2		46,98	38,74
R		1288,000	
S1	35	21,512	59,87
S2		24,131	53,37
Pyroxulam			
R		704,600	
S1	14	32,300	21,81
S2		43,100	16,35
R		745,800	
S1	35	2,887	258,33
S2		3,807	195,90

		Imazetapir	
R		2115,000	
S1	14	174,800	12,10
S2		68,600	30,83
R		460,000	
S1	35	20,430	22,52
S2		17,090	26,92

Fonte: Dados do Autor

Os valores do fator F obtidos permitem afirmar que os biótipos estudados apresentam relações distintas na redução de massa seca (Tabela 2). Os maiores fatores de resistência aos 35 DAA foram, respectivamente, para os herbicidas piroxulam, metsulfurom - metílico, bispiribaque sódico e imazetapir.

Diante dos dados de controle, massa seca e fator F é possível afirmar que o biótipo R de flor - roxa apresenta resistência cruzada aos herbicidas inibidores da enzima ALS, essa por sua vez variando de intensidade. Essa variação de intensidade que praticamente em todos os herbicidas testados aos 14 DAA foi mais baixa que aos 35 DAA está relacionada ao tempo de ação de cada herbicida, que por sua vez podem ser interferidos pela presença de tricomas presentes nas folhas. Pois a presença de tricomas na superfície foliar podem interceptar gotas pulverizadas, impedindo que estas alcancem a epiderme, essa ação pode ocorrer mesmo quando os tricomas são simples e apresentam-se em baixas densidades, pois, ocorre a aderência de gotas sobre eles (FERREIRA et al., 2002).

Em trabalho realizado com *Echinochloa crusgalli* a aplicação de herbicidas inibidores da enzima ALS, de três diferentes grupos químicos (imidazolinonas, pirimidiniloxibenzoico e triazolpirimidinas), não controlaram satisfatoriamente o biótipo resistente, sugerindo que este apresenta resistência cruzada, e que herbicidas alternativos devem ser utilizados para realizar o controle da espécie (BONOW et al., 2018).

Considerando que as doses foram as de rótulo de cada herbicida, ambos os biótipos resistentes apresentaram a dose do DL 50 acima da recomendada, o que era esperado, pois na maioria dos casos a resistência aos inibidores da ALS se deve a uma mutação na enzima (YU et al., 2012), o que exige doses altas para controle das plantas resistentes (BECKIE et al., 2012). Altas taxas de resistência (F) observadas em estudos podem estar relacionadas com a elevada suscetibilidade da população sensível (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2005).

3.5 Conclusão

O biótipo R de flor - roxa possui resistência cruzada aos herbicidas pertencentes aos grupos químicos imidazolinonas, sulfoniluréias, sulfonilidas e pirimidil tiobenzoatos.

4 CAPÍTULO II

Propriedades enzimáticas da Acetolactato Sintase (ALS) e mecanismos de resistência não relacionados ao local de ação (NRLA) em *Echium plantagineum*

4.1 Resumo

A espécie *Echium plantagineum* está presente em lavouras de cereais de inverno e áreas de pastagens distribuídas no Sul do país. Nos últimos anos foram relatados casos de resistência da espécie ao herbicida metsulfurom - metílico e resistência cruzada aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). O uso em demasia e de forma errônea de herbicidas, acaba favorecendo o surgimento de novos biótipos tolerantes a altas doses e até mesmo resistentes a enzima ALS. Objetivou-se caracterizar os parâmetros enzimáticos; obter a dose resposta in vitro da enzima ALS ao herbicida imazapic e avaliar a resposta à aplicação de metsulfurom-metílico após tratamento com inibidores do metabolismo da citocromo P450 monooxigenase nas populações em estudo. A extração da enzima ALS e o bioexperimento in vitro seguiu a metodologia descrita em literatura. Conduziu-se experimentos em casa de vegetação e laboratório na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, em Passo Fundo no ano de 2018. 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 ($V_{m\acute{a}x}$). Para o experimento de metabolização pelo complexo citocromo P450 monooxigenase, os tratamentos utilizados foram aplicação de inibidor da citocromo P450 monooxigenase (malathion) associado ao herbicida metsulfurom-metil, o herbicida isolado e tratamento sem nenhuma aplicação. Os parâmetros avaliados foram controle e massa seca da parte aérea (MSPA). O biótipo resistente demonstrou insensibilidade ao herbicida imazapic. Com base nos parâmetros cinéticos da enzima ALS, ocorre alteração nos mesmos, caracterizando baixa afinidade do substrato (piruvato) pela enzima e maior $V_{m\acute{a}x}$ nas populações resistentes, o que confere resistência do biótipo R. Também há envolvimento do complexo citocromo P450 monooxigenase na resistência de *E. plantagineum* aos herbicidas inibidores da ALS, visto que o biótipo R é controlado quando há aplicação de malathion 30 minutos antes da aplicação do herbicida metsulfurom-metílico.

Palavras-chave: 1. Citocromo P450 monooxigenase. 2. Experimento enzimático. 3. Malathion. 4. Parâmetros cinéticos. 5. Substrato.

4.2 Introdução

A espécie *Echium plantagineum* está presente em lavouras de cereais de inverno e áreas de pastagens distribuídas no Sul do país. Nos últimos anos foram relatados casos de resistência da espécie ao herbicida metsulfurom - metílico e resistência cruzada aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) (PERUZZO, 2016).

A aceto-hidroxiácido sintase (ALS/AHAS), é a primeira enzima na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina (MCCOURT e DUGGLEBY, 2008). A inibição da ALS leva à inativação desses aminoácidos, o que por sua vez causa a morte da planta. Dentro desse grupo mundialmente são conhecidas cinco famílias químicas de herbicidas comercialmente disponíveis os quais atuam no mesmo sítio de ação da enzima ALS sulfonilureias, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinilbenzoatos e sulfonilidas (OLIVEIRA Jr., 2011), sendo no Brasil encontrado somente herbicidas representantes dos quatro primeiros grupos. O uso demasiado desses herbicidas está atrelado ao baixo impacto ambiental, baixa toxicidade em mamíferos, ampla seletividade das culturas e alta eficácia de controle com baixa taxa de dose ((DUGGLEBY, 2008).

Todavia, o uso em demasia e de forma errônea desses produtos, acaba favorecendo o surgimento de novos biótipos tolerantes a altas doses e até mesmo resistentes a enzima ALS. 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 (YU; POWLES, 2014). Frequentemente se tem relatos de que em plantas resistentes a resistência está atrelada quase que exclusivamente a substituição de aminoácidos na enzima ALS, porém a resistência pode estar atrelada ao local não alvo da enzima. Atualmente se tem elucidado alterações em oito posições do gene ALS, que irão corresponder a 24 substituições conhecidas de aminoácidos, essas mutações interrompem a ligação do herbicida convertendo assim a enzima antes suscetível em enzima resistente ao herbicida (TRANSEL; WRIGHT; HEAP, 2019).

As mutações no gene de ALS podem afetar a estrutura e função da enzima, reduzindo assim a atividade da enzima e afinidade herbicida com o local alvo (HAN et al., 2013). Por exemplo, a substituição de Trp574-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 imidazolinonas mas não aos herbicidas sulfoniluréias (BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012).

Estudos revelaram cada vez mais que inúmeras resistências de plantas daninhas não estão vinculadas a uma mutação específica no local de destino da ação herbicida, em vez disso, a resistência, está relacionada aos diversos genes que estão envolvidos em respostas ao estresse abiótico (DÉLYE, 2013). Esses mecanismo de resistência a herbicidas não dotados de mutações no sítio de ação, geralmente, envolvem desintoxicação dos herbicidas pela glutatona S-transferase (TAL; HALL; STEPHENON, 1995) ou citocromo P450 monooxygenase (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).

Isso deixa claro uma vez que o envolvimento de diferentes atividades enzimáticas de mecanismos não envolvidos ao local alvo, podem reduzir a taxa de penetração dos herbicidas, a translocação na planta, ou até mesmo aumentar a degradação das moléculas de herbicidas por enzimas que contribuem para o metabolismo geral da planta (YU et al, 2009). Em função disso tem sido proposto que o determinismo genético de mecanismos não alvo possa ser poligênico (PETIT et al., 2010). Diante do exposto objetivou-se caracterizar os parâmetros enzimáticos; obter a dose resposta in vitro da enzima ALS ao herbicida imazapic e avaliar a resposta à aplicação de metsulfurom-metílico após tratamento com inibidores do metabolismo da citocromo P450 monooxygenase nas populações em estudo.

4.3 Material e Métodos

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 semeadas em vasos plásticos contendo substrato, 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 experimento de dose - resposta ao herbicida imazapic e o experimento atividade da enzima ALS. Esse experimento foi conduzido no período de maio de 2018 a novembro de 2018.

Para a realização do experimento de metabolização do citocromo P450 monooxigenase, as plantas foram conduzidas em vasos plásticos dentro de casa – de - vegetação

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 *Echium plantagineum* desprovidas das nervuras. Coletou-se 7 g de material vegetal (folhas) que foram congelados em nitrogênio líquido (N₂) 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 (MgCl₂); 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.

Bioexperimento “in vitro” com a enzima ALS

O experimento foi realizado em delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições. O bioexperimento “in vitro” foi realizado seguindo a metodologia proposta por Yu et al., (2010) com algumas modificações. O bioexperimento foi realizado em tubos de experimento, sendo os tratamentos arranjados em esquema fatorial, tendo como fator A, a solução enzimática das (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 experimento. Cada tubo recebeu ainda 150 µL do tampão de reação fosfato 80 µM, pH=7,0, contendo 20 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 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 bioexperimento, sendo que em um deles, denominado zero, adicionou-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 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 absorbância 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 experimento, 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 H₂SO₄ 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 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 absorbância 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 experimento com três repetições. Cada tubo conteve 300 μL de solução de acetoína nas concentrações de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200 μM mais 150 μL do tampão de reação fosfato 80 μM , pH=7,0. Para a formação do complexo colorido foi adicionado em cada tubo 500 μL de solução de creatina e 500 μL 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 $V_{\text{máx}}$ informam a afinidade da enzima com o substrato. Para a obtenção do K_M e do $V_{\text{máx}}$, realizou-se o experimento utilizando dez concentrações do substrato (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 100 mM) em todas as populações de *Echium plantagineum*. As concentrações do substrato foram obtidas através da combinação entre o tampão de reação fosfato 80 μM , pH 7,0, com a solução padrão de piruvato a 100 mM. Ao tampão de reação fosfato 80 μM , pH 7,0 adicionou-se 20 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), 2 mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20 μM 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 $V_{\text{máx}}$ foram determinados através da equação de Michaelis Menten (Equação 1), utilizando o software SigmaPlot 12.5.

$$Y = (V_{\text{máx}} * X) / K_M + X$$

Equação 1- y = atividade da enzima ALS ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$); $V_{\text{máx}}$ = 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 I50, que representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima, através do modelo de regressão não linear sigmoideal logístico de três parâmetros (Equação 2) (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995), utilizando o software SigmaPlot 12.5

$$Y = a / (1 + (x/xI50)^b)$$

Equação 2- y = atividade da enzima ALS (%); a = assíntota de máxima; x = dose do herbicida imazapic (μM); $xI50$ = dose do herbicida imazapic (μM) correspondente a 50% da inibição da enzima ALS e b = declividade da curva.

O fator de resistência (FR) foi calculado pela divisão do I50 do biótipo resistente pelo valor correspondente do biótipo suscetível. Esse valor 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 foram mensurados 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.

Metabolização do citocromo P450 monooxigenase

Para o avaliação da metabolização do complexo citocromo P450 monooxigenase realizou-se aplicação 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^{-1} , quando as plantas apresentaram de três a quatro folhas desenvolvidas. 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 aos biótipos R, S e S2 de flor - roxa e, o fator B avaliou o inibidor 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⁻¹, aplicou-se o inibidor de metabolização malathion na dose de 500 g i.a. ha⁻¹ 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 massa 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.

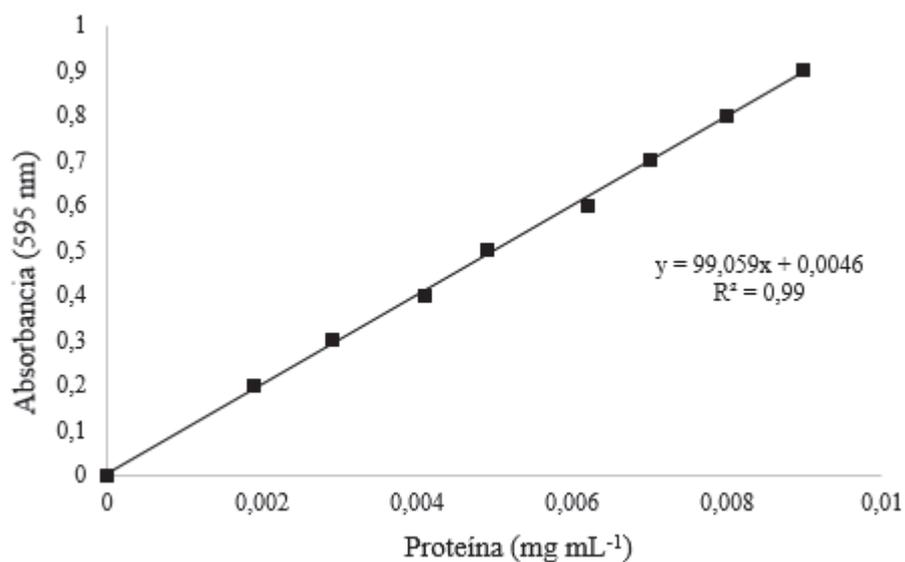
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Quando significativos, realizou-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4 Resultados e Discussão

Bioexperimento “*in vitro*” da enzima ALS com o herbicida Imazapic

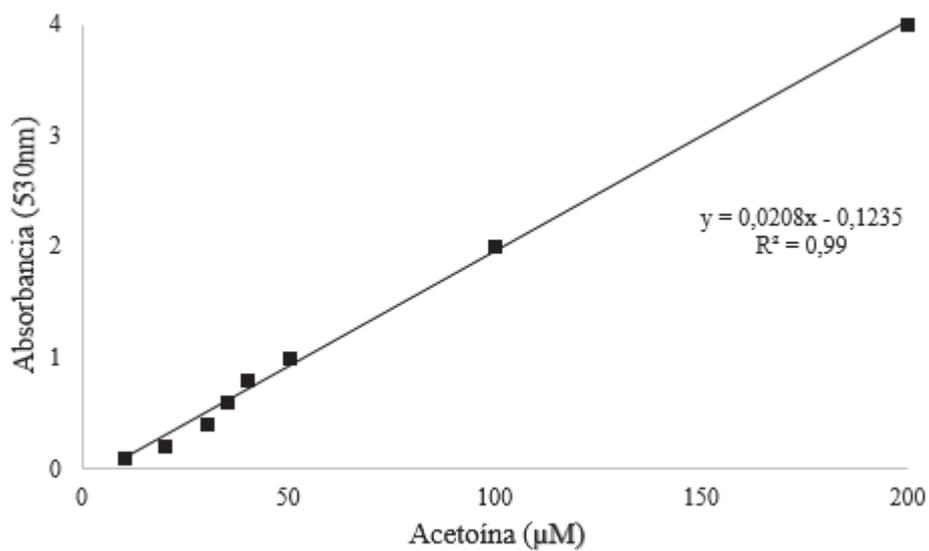
Os parâmetros enzimáticos da enzima ALS para as populações de *E. plantagineum*, resistentes e suscetíveis ao herbicida metsulfurom-metil foram obtidos através da produção de acetoína e do teor de proteína (Figuras 6 e 7). A partir dos resultados obtidos, construíram-se as curvas padrão para proteína e acetoína utilizadas nos experimentos.

Figura 6 - Curva padrão de proteína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS



Fonte: Dados do Autor

Figura 7 - Curva padrão de acetoína produzida para a determinação da atividade da enzima ALS.

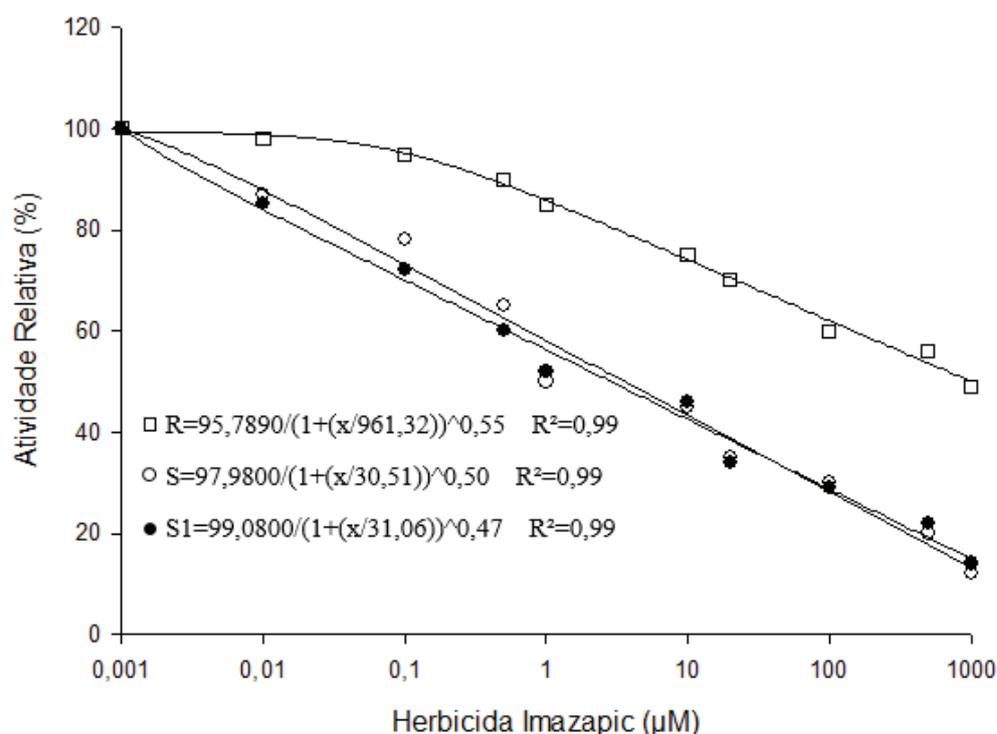


Fonte: Dados do Autor

A partir das curvas que quantificam a extração da enzima ALS observa-se que a enzima ALS para as populações sensíveis foram altamente inibidas pelo herbicida imazapic, sendo que conforme o aumento de dose maior foi a inibição da enzima, chegando a aproximadamente 90% de inibição para os biótipos S1 e S2 (Figura 8).

Para a população resistente de flor-roxa é possível comprovar a resistência desse biótipo ao herbicida imazapic, visto que o biótipo R apresentou baixa resposta a inibição enzimática do herbicida (Figura 8), uma vez que a inibição chegou a aproximadamente 58%, na maior dose (1000 μ M) utilizada do produto, o que por sua vez indica uma maior insensibilidade do biótipo R ao herbicida, em relação aos biótipos S1 e S2. Resultados semelhantes foram demonstrados por ambas as espécies em resposta as doses crescentes do herbicida metsulfurom-metil no Capítulo I.

Figura 8 - Atividade relativa da enzima ALS em função de doses crescentes do herbicida Imazapic em três populações de *E. plantagineum*, sendo uma resistente (R) e duas suscetíveis (S1 e S2) ao herbicida metsulfurom - metílico.



Fonte: Dados do Autor

Em trabalho realizado com distintos biótipos de *L. rigidum* observou-se alta inibição da enzima ALS onde, doses de 0,0075 μM para a enzima ALS do biótipo suscetível e, doses entre 0,71 e 1,81 μM para biótipos resistentes ao herbicida sulfometurom foram suficientes para reduzir 50% da atividade enzimática (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos em biótipos de *R. raphanistrum*, quando trabalhado com o herbicida clorosulfurom, que 1,55 e 0,009 μM form suficientes para reduzir em 50% a atividade enzimática dos biótipos R e S respectivamente (YU et al., 2012).

Os valores de I50 e fator F são observados na Tabela 3. A quantidade do herbicida imazapic necessária para atingir a inibição de 50% da atividade da enzima ALS (I50) para os biótipos suscetíveis (S1 e S2) de flor- roxa foram de 28,08 e 29,85 μM , respectivamente. Já para o biótipo R foi necessário 819 vezes o valor da I50 da população suscetível, demonstrando alta resistência (fator F), os quais foram respectivamente 29,17 e 27,44. Para o biótipo S o fator F foi superior ao observado para o biótipo S2.

Tabela 3 - Dose do herbicida Imazapic (μM) necessária para inibir 50% da atividade da enzima ALS (I₅₀) e fator de resistência (F) de *E. plantagineum* Resistente (R) e Suscetível (S e S2)

Espécie	Biótipo	I ₅₀ (μM)	Fator F
<i>E. plantagineum</i>	Resistente (R)	819,00	29,17
	Suscetível (S1)	28,08	27,44
	Suscetível (S2)	29,85	

Fonte: Dados do Autor

Em distintos trabalhos realizados com *Raphanus sativus*, observaram-se valores elevados de resistência (Fator F >5000) para herbicidas pertencentes ao grupo das imidazolinonas, que apresentavam polimorfismo no gene ALS, posição Trp-574-Leu, (PANDOLFO et al., 2016). Já em trabalho realizado no ano de 2017 com *R. sativus* também evidenciou elevados valores de resistência para o grupo das imidazolinonas (CECHIN et al., 2017). Nos casos em que a resistência está atrelada a alterações nas substituições de bases pode-se afirmar que a substituição de Trp-Leu-574 é considerada

a mutação mais relevante porque ele confere resistência a todos os cinco grupos de químicos a inibidores da ALS herbicidas (PANDOLFO et al., 2016).

Através dos resultados observados no experimento de curva de dose resposta que comprovam a resistência cruzada do biótipo R aos herbicidas inibidores da enzima ALS, os quais pertencem aos grupos químicos sulfoniluréias, imidazolininas sulfonilidas e pirimidiltiobenzoatos. No presente capítulo que trata sobre as propriedades enzimáticas da enzima ALS e sobre mecanismos de resistência não relacionados ao local de ação também é possível afirmar que o biótipo R é resistente, pois conforme mostram os dados o fator F é superior a 10 o que por sua vez indica resistência.

A sobrevivência de biótipos pode ocorrer devido a fatores que podem estar relacionados com o destino herbicida, o qual por sua vez pode estar relacionado ao local alvo ou ao local não alvo de ação do herbicida (YUAN et al., 2007). A ocorrência de mutações na sequência dos genes do DNA e a sobre-expressão da enzima ALS são possíveis fatores que resultam em redução da sensibilidade ao herbicida devido a um nível tanto insuficiente ou excessivo de produto que chega a seu destino (DUGGLEBY et al., 2008; HAN et al., 2012).

Em espécies como nabo (*Raphanus raphanistrum*) com mutação confirmada em Trp-574-Leu, foi relatada a resistência às três principais classes herbicidas inibidores da ALS, (sulfoniluréias, imidazolinonas e triazolpirimidinas) (YU et al., 2012), já para a espécie de *Poa annua*, com mutação no mesmo local que para *R. raphanistrum*, a resistência a enzima ALS foi expressa nos grupos químicos pirimidil-benzoatos, sulfoniluréias e imidazolinonas (McELROY et al., 2013).

As mutações ocorrentes na posição Trp-574, Ala-122 e Pro-197 apresentam características de serem mutações mais fortes e tem como características principal apresentar elevado fator de resistência (Fator F), aos herbicidas inibidores da enzima ALS (YU E POWLES, 2014). A exemplo das mutações que se relacionam ao local alvo (target site), podem ser destacadas as mutações no gene de ALS que tendem a afetar a estrutura

e função da enzima, reduzindo assim a atividade da enzima e afinidade herbicida com o local alvo (HAN et al., 2012).

Bioexperimento “*in vitro*” da atividade enzimática da ALS

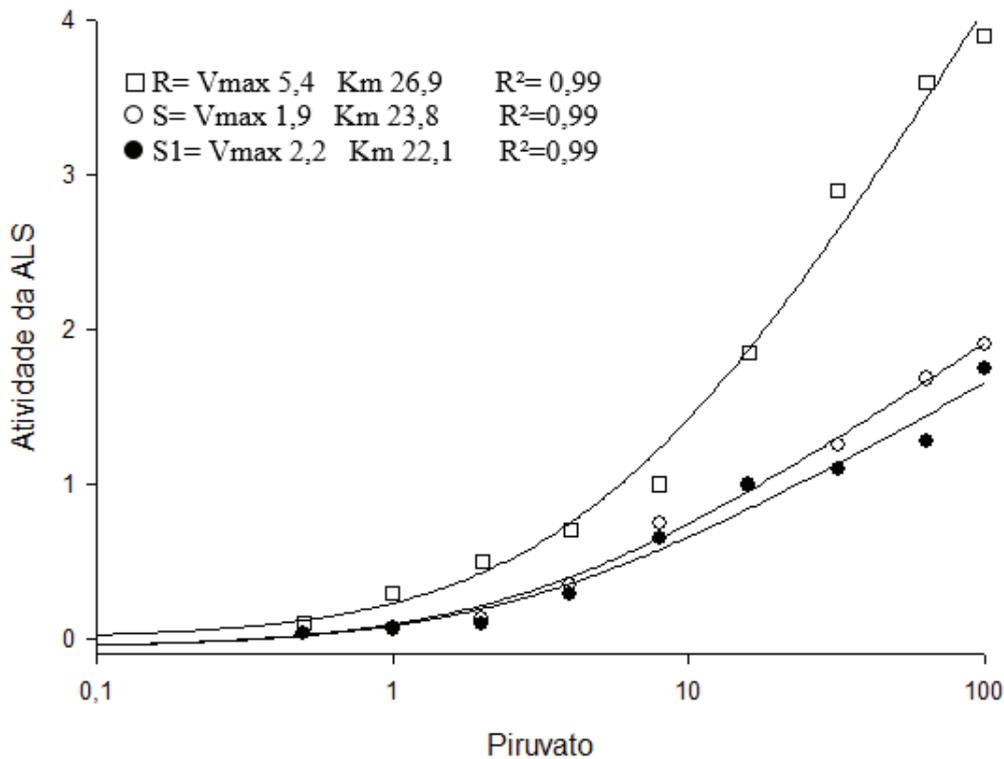
Para o biótipo resistente, os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m da enzima ALS foram superiores àqueles encontrados para os biótipos sensíveis (Figura 8). Comparando-se os parâmetros do biótipo R em relação aos biótipos S1 e S2, observou-se que o V_{max} do biótipo R foi 2,84 e 2,45 vezes superior em relação ao dos biótipos S1 e S2 e o K_m foram 1,13 e 1,22 vezes superiores em relação aos biótipos S1 e S2, respectivamente (Figura 9).

Os valores de V_{max} dos biótipos S1 e S2 foram similares entre si (1,9 e 2,2 mM respectivamente), o mesmo pode ser observado nos valores de K_m os quais corresponderam a 23,8 e 22,1 respectivamente (Figura 9). A presença desses valores muito similares entre si, estão de acordo com o que foi relatado em outros trabalhos e por sua vez mostram que há alteração na atividade enzimática, a qual pode estar associada a resistência de *E. plantagineum* aos herbicidas inibidores da enzima ALS (LI et al., 2013).

A baixa afinidade da enzima ($> K_m$) pelo substrato (piruvato) pode ser compensada pela alta eficiência na conversão de piruvato, caracterizado pelo maior V_{max} . O acoplamento do substrato pode ser realizado no mesmo local ou em diferentes locais da enzima, já que mutações a nível enzimático afetam a conformação do sítio de ação (DEWAELE et al., 1997).

Em estudo realizado com diferentes biótipos de *Euphorbia heterophylla*, que apresentavam resistência múltipla a herbicidas inibidores da enzima ALS e inibidores de PROTOX, observou-se maior afinidade da enzima pelo substrato para os biótipos suscetíveis, caracterizado assim baixo valor de K_m do biótipo suscetível comparado aos biótipos resistentes, e que por sua vez não expressou diferenças acentuadas na velocidade máxima de reação (XAVIER et al., 2013).

Figura 9 - Atividade da enzima ALS em função de diferentes concentrações de piruvato em três populações de *E. plantagineum*, sendo uma resistente (R) e duas suscetíveis (S1 e S2) ao herbicida metsulfurom metílico. K_M = concentração de piruvato que fornece a velocidade inicial igual a metade da velocidade de reação; V_{max} = velocidade máxima de reação.



Fonte: Dados do Autor

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 ($V_{máx}$ 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).

Podem haver casos não ocorrem alterações nos parâmetros cinéticos, a exemplo dessa afirmação de não expressão de diferenças nos parâmetros cinéticos da enzima ALS puderam ser observadas em biótipos de *Conyza sumatrensis* (SANTOS et al., 2014), e em *Lactuca serriola* (PRESTON et al., 2006), e em *Poa annua*, contendo a mutação Trp-574-Leu, não houve alteração nos parâmetros cinéticos KM e V_{máx} (CROSS et al., 2015). Através desses estudos é possível concluir que nem sempre mutações no sítio específico de ação herbicidas irão promover alterações na atividade enzimática, visto que a enzima pode se acoplar em locais distintos

Metabolização do citocromo P450 monooxigenase

A análise dos de metabolização do citocromo P450 monooxigenase indicaram haver interação para as variáveis controle e massa seca (Tabela 4). Avaliando-se a resposta de cada tratamento foi possível observar que no tratamento que continha o herbicida metsulfurom - metílico mais malathion o controle entre os biótipos não diferiu, sendo que o mesmo ficou acima de 90% para os três biótipos estudados (Tabela 4). Essa resposta evidencia que há envolvimento do complexo P450 na resposta a resistência do biótipo R aos herbicidas inibidores da enzima ALS.

Já a resposta para o uso somente do herbicida metsulfurom- metílico, seguiu o mesmo padrão do que aquele observado no Capítulo I, sendo que o biótipo R não é controlado com a aplicação do herbicida, já os biótipos S1 e S2 são controlados de maneira satisfatória (Tabela 4).

Casos de resistência atribuídos a metabolização tem sido mais frequentemente relatos em espécies de plantas daninhas poáceas do que em espécies de folhas largas (TARDIF, 2012), todavia em espécies de eudicotiledôneas também há relatos de ocorrência de resistência atrelada a metabolização.

Tabela 4 - Controle (%) e massa seca da parte aérea (MSPA) aos 30 dias após aplicação (DAA) de metsulfurom-metílico, isolado ou antecedido em 30 minutos da aplicação de malathion (inibidor do citocromo P450 monooxigenase) e, testemunha sem nenhuma aplicação

Tratamento	<i>Echium plantagineum</i> - Controle (%)		
	R	S1	S2
Metsulfurom - metílico + malathion	92,8 ^{ns} A	97,4 A	97,8 A
Metsulfurom - metílico	0 bB	96,5 aA	97 aA
Testemunha	0 B	0 B	0 B
CV (%)	2,51		

Tratamento	<i>Echium plantagineum</i> - Massa (gr)		
	R	S	S2
Metsulfurom - metílico + malathion	0,95 ^{ns} B	0,42 B	0,34 B
Metsulfurom - metílico	9,11 aA	0,55 bB	0,44 bB
Testemunha	9,90 A	9,70 A	9,60 A
CV (%)	19,1		

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

Fonte: Dados do Autor

Dentre os poucos casos de espécies eudicotiledôneas com resistência devido a metabolização, esses estão relacionados a resistência metabólica devida ao complexo P450 monooxigenase (YU; POWLES, 2014). Em muitas vezes, a resistência metabólica é assumida pela 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* (BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012).

O acúmulo de dois mecanismos de resistência (sítio de ação alterado e metabolização pelo complexo P450) tem sido relatado em *L. rigidum* e *Alopecurus myosuroides* (POWLES; YU, 2010; YU; POWLES, 2014). Em trabalho realizado com

R. sativus observou-se que a aplicação de inibidor do citocromo P 450 monooxigenase seguido pela aplicação de herbicidas iodosulfuron ou imazetapir não controlaram eficientemente os biótipos (CECHIN et al., 2017). O que no estudo com flor - roxa foi observado de forma distinta apresentando, por sua vez, controle de todos os biótipos (Tabela 4). Com esses resultados é possível afirmar que há indícios de envolvimento do complexo citocromo P450 monooxigenase na resistência de *E. plantagineum*.

4.5 Conclusões

O biótipo R é resistente ao herbicida imazapic quando o mesmo foi testado no bioexperimento *in vitro* da enzima ALS. Ambos os biótipos S1 e S2 são altamente suscetíveis a esse herbicida.

Ocorre alteração nos parâmetros cinéticos da enzima, caracterizando baixa afinidade do substrato (piruvato) pela enzima e maior $V_{m\acute{a}x}$ na população resistente.

O complexo citocromo P450 monooxigenase está envolvido na resistência de *E. plantagineum* aos herbicidas inibidores da ALS, visto que o biótipo R é controlado quando há aplicação de malathion 30 minutos antes da aplicação do herbicida metsulfurom-metílico.

5 CAPÍTULO III

Análise de crescimento, caracterização morfoanatômica e contagem de cromossomos de biótipos resistente e suscetíveis de *Echium plantagineum*

5.1 Resumo

A análise de crescimento é uma técnica que detalha as mudanças morfofisiológicas da planta. Em função do tempo é possível caracterizar e entender o comportamento de diferentes espécies ou biótipos, por meio do acúmulo de massa seca o que por sua vez também serve de comparativo entre uma mesma espécie, como por exemplo *Echium plantagineum* que apresenta biótipos resistente e suscetíveis ao herbicida metsulfurom – metílico com comportamentos distintos no ambiente. Diante disso, objetivou-se avaliar o crescimento e desenvolvimento morfofisiológico ao longo do ciclo de diferentes biótipos de *Echium plantagineum*, assim como a contagem cromossômica da espécie. Foram realizados experimentos em casa de vegetação e em laboratório. O experimento de análise de crescimento foi desenvolvido de julho/2017 a janeiro/2018. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, seguindo esquema fatorial (3 x 17), compostos de 17 épocas de avaliação e três biótipos de flor-roxa (resistente – R; suscetível 1 S1 e suscetível 2 S2). Com base nos dados de área foliar e massa seca acumulada, foram determinadas: taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de crescimento absoluto (TCA) e taxa de crescimento da cultura (TCC). A fim de realizar a análise histológica foram coletadas folhas e raízes quando a espécie estava com 14 dias após a emergência e no florescimento pleno. As folhas e fragmentos de raízes foram coletadas e imediatamente fixadas em FAA 70 (Formol-Ácido Acético-Álcool, 5:5:90 v/v), após a fixação, o material foi estocado imerso em etanol 70 °GL até a montagem das lâminas. Foram realizadas a determinação da espessura da epiderme na face adaxial das folhas dos biótipos e o diâmetro dos feixes vasculares principais nos biótipos resistentes e suscetível ao herbicida metsulfurom metílico. Para avaliar o número de estômatos nos distintos biótipos, foram coletadas folhas quando as plantas encontravam-se no início do período reprodutivo, sendo preparadas três lâminas por folha. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. As lâminas para a contagem dos estômatos foram preparadas com a aplicação de esmalte incolor na superfície foliar abaxial. Após a obtenção dos dados, os mesmos foram aplicados à fórmula para determinação da densidade estomática (mm²). Para a citológica visando a confirmação do nível de ploidia utilizaram-se pontas de raízes em crescimento, as análises foram realizadas nas células cujos cromossomos apresentavam-se completamente espalhados e bem condensados, em microscópio ótico com aumento de 1000X, para realização da contagem de cromossomos. Constatou-se que entre as populações resistente e suscetível de *E. plantagineum* ocorrem diferenças quanto ao seu comportamento em

relação ao crescimento e desenvolvimento de plantas. Com relação as características morfoanatômicas, número de estômatos e ploidia da espécie não ocorrem diferenças entre os biótipos estudado.

Palavras-chave: 1. Anatomia foliar. 2. Comportamento de espécies. 3. Flor - roxa. 4. Ploidia. 5. Viabilidade genética.

5.2 Introdução

O conhecimento da biologia das plantas daninhas é fundamental para que estratégias corretas de manejo sejam adotadas. O estudo biológico vegetal abrange a morfologia, germinação, fisiologia, hábito de crescimento, capacidade competitiva e reprodutiva. Esses estudos resultam no conhecimento dos diferentes estágios de susceptibilidade para o controle de forma eficaz (e sem agredir o meio ambiente) (GOMES JR; CHRISTOFFOLETI, 2008).

Echium plantagineum (flor-roxa) caracteriza-se por ser uma espécie pertencente à família Boraginaceae, encontra-se amplamente disseminada na região Sul do Rio Grande do Sul, povoa áreas de campo, pastagens (KISSMANN, 1999) e mais recentemente migrou para as áreas de culturas anuais de inverno. Quando convive junto com culturas, a flor-roxa compete com a espécie cultivada e tende a reduzir o rendimento de grãos. Há um vasta possibilidade de os maiores danos ocorrem quando as plantas de flor-roxa não forem manejadas de forma correta, pois acaba ocorrendo competição pelos recursos do meio. Todavia para que isso seja possível ser afirmado de toda certeza com se faz necessário conhecer o seu comportamento morfológico e biológico da espécie.

A análise de crescimento é uma técnica que detalha as mudanças morfofisiológicas da planta, em função do tempo, caracterizadas pela alteração na produção de massa seca (ALVAREZ et al., 2012). O uso da técnica de análise de crescimento permite caracterizar e entender o comportamento diferenciado de cultivares, por meio do acúmulo de massa seca (FALQUETO et al. 2009, CONCENÇO et al. 2011), o que por sua vez também serve de comparativo entre uma mesma espécie que apresenta biótipos com comportamentos distintos no ambiente, como por exemplo plantas que apresentam biótipos resistentes. As

informações resultantes podem ser utilizadas para verificar a adaptação da cultura a novos ambientes, competição interespecífica e efeitos de sistemas de manejo, além do potencial produtivo de diferentes cultivares (ANTONIAZZI; DESCHAMPS 2006, FALQUETO et al. 2009).

Outros fatores que são importantes avaliar quando se tem o intuito de caracterizar uma espécie que apresenta distintos comportamentos é o seu desenvolvimento foliar, pela observação da espessura das folhas e suas estruturas internas, assim como do o comportamento do desenvolvimento do sistema radicular (BENINCASA, 2003).

As diferenças na suscetibilidade de espécies de plantas daninhas a herbicidas são atribuídas ao estágio de desenvolvimento da planta, a diferenças na morfologia (área e forma do limbo e ângulos das folhas em relação ao jato de pulverização), à anatomia foliar (presença de estômatos e tricomas, espessura e composição da camada cuticular) e a diferenças na absorção, translocação, compartimentalização e metabolização da molécula herbicida (TUFFI SANTOS et al., 2004).

Características morfológicas das folhas influenciam na quantidade de herbicida interceptado e retido; contudo, são características anatômicas que determinam a facilidade com que esses produtos serão absorvidos (RUCHEL et al., 2015). A descrição anatômica das folhas de biótipos de *Echium plantagineum* resistente e suscetíveis ao herbicida metsulfurom metílico se justifica, a fim de verificar se possíveis alterações morfológicas causarão efeitos na absorção e/ou translocação e, conseqüentemente, na sensibilidade ao herbicida.

Além dessas alterações morfoanatômicas a variabilidade genética entre plantas é outro ponto que determina a capacidade de resposta à seleção natural e às pressões impostas em função de técnicas de manejo utilizadas (RUCHEL, 2015). Portanto, se faz necessário o conhecimento das características bio-ecológicas, assim como o comportamento dos biótipos de plantas daninhas resistente e suscetível, a fim de estabelecer estratégias de gestão com vista à prevenção de resistência (BONOW et al., 2018). Diante disso, objetivou-se avaliar o crescimento e desenvolvimento

morfofisiológico ao longo do ciclo de diferentes biótipos de *Echium plantagineum* (EHIPL), assim como a contagem cromossômica da espécie.

5.3 Material e Métodos

Análise de crescimento

Primeiramente foi quantificado o índice de velocidade de emergência dos diferentes biótipos de flor – roxa (Dados não mostrados), a fim de uniformizar o experimento de análise de crescimento. O experimento foi desenvolvido de junho/2017 a janeiro/2018, em casa-de-vegetação. As unidades experimentais consistiram de vasos plásticos, com capacidade de 10 litros, os quais foram preenchidos com substrato comercial do tipo Turfa Fértil®. Após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Diariamente foi observada a temperatura na casa-de-vegetação (Figura 10).

Figura 10 - Temperatura média diária em casa-de-vegetação ao longo do desenvolvimento de *Echium plantagineum*



Fonte: Dados do Autor

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, seguindo esquema fatorial (3 x 17), compostos de 17 épocas de avaliação, três biótipos de flor-roxa (resistente – R; suscetível S1 e suscetível 1 S2) e cinco repetições. As avaliações de raízes foram realizadas com auxílio de um escâner onde foi possível obter informações referentes ao comprimento. Após, as partes aérea e radicular das plantas foram postas para secar em estufa a 65 °C com circulação de ar forçada até obter massa constante e, posteriormente, pesadas em balança analítica de precisão para a determinação da massa seca de parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST).

Com base nos resultados de área foliar e massa seca acumulada, foram determinadas: taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de crescimento absoluto (TCA) e taxa de crescimento da cultura (TCC), conforme descrito por Benincasa (2003).

A TCR expressa o crescimento da planta em intervalo de tempo, em relação à massa seca acumulada no início desse intervalo, pela fórmula:

$$TCR = (\ln P_n - \ln P_{n-1}) / (T_n - T_{n-1}),$$

Em que $\ln P_n$ é o logaritmo neperiano da massa seca acumulada até a avaliação n ; $\ln P_{n-1}$ é o logaritmo neperiano da massa seca acumulada até a avaliação $n-1$; T_n é o número de dias após a emergência por ocasião da avaliação n ; e T_{n-1} é o número de dias após a emergência por ocasião da avaliação $n-1$.

A taxa de crescimento absoluto (TCA) fornece uma estimativa da velocidade média de crescimento das plantas, ao longo do período de observação (AGUILERA et al., 2004), a qual foi expressa pela fórmula,

$$TCA = (P_2 - P_1) / (T_n - T_1).$$

A TCC indica o acúmulo de massa seca ao longo do tempo e foi calculada por: $TCC = TAL \times IAF$. A taxa de assimilação líquida (TAL) foi calculada pela fórmula, $TAL = [(P_n - P_{n-1}) / (T_n - T_{n-1})] \times [(ln A_n - ln A_{n-1}) / (A_n - A_{n-1})]$ em que A_n é a área foliar e A_{n-1} é a área foliar da planta por ocasião da avaliação n-1.

Após obtenção dos resultados os mesmos foram submetidos à análise de variância e quando significativos ($p < 0,05$) empregaram-se modelos de regressão exponencial, polinomiais quadrático e cúbico. A escolha do modelo levou em conta a a lógica do fenômeno biológico e o valor do coeficiente de determinação.

Produção de sementes

Para realizar a contagem de sementes as mesmas foram coletadas de quatro plantas de cada biótipo (R, S1 e S2) durante toda a fase de maturação. Após a obtenção dos dados os mesmos foram submetidos a análise de variância e havendo significância empregou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Caracterização morfológica

A fim de realizar a análise histológica foram coletadas folhas e raízes quando a espécie estava com 14 dias após a emergência e no florescimento pleno. As folhas e fragmentos de raízes foram coletadas e imediatamente fixadas em FAA 70 (Formol-Ácido Acético-Álcool, 5:5:90 v/v), onde permaneceram por 48 horas.

Após a fixação, o material foi estocado imerso em etanol 70 °GL até a montagem das lâminas. Foram utilizadas as folhas mais desenvolvidas dos biótipos, e as secções realizadas no terço médio da folha, no sentido transversal. As secções histológicas foram feitas manualmente, com lâminas de inox. As secções selecionadas foram clarificadas em hipoclorito de sódio na concentração de 20%, para que o material perdesse toda coloração natural.

Posteriormente, o material foi lavado em água acidulada e destilada. A coloração das secções foi realizada através dos corantes fucsina básica e azul de Alcian. Após a coloração, as lâminas foram montadas em glicerina 50% como meio de montagem. Para a vedação entre lâmina e lamínula, utilizou-se esmalte de unha incolor.

Foram realizadas a determinação da espessura da epiderme na face adaxial das folhas dos biótipos e o diâmetro dos feixes vasculares principais nos biótipos resistentes e suscetível ao herbicida metsulfurom metílico. As análises histológicas foram realizadas utilizando-se microscópio óptico (Olympus® modelo CX31), e o registro fotográfico foi realizado com câmera AxioCam ERc5s – ZEISS, e foram tomadas no mínimo quatro leituras em cada lâmina.

Contagem estomática

Para avaliar o número de estômatos nos biótipos de flor - roxa, foram coletadas folhas quando as plantas encontravam-se no início do período reprodutivo. Foram escolhidas folhas saudáveis e com ausência visível de lesões. Após as coletas as folhas foram levadas para laboratório e a fim de realizar a contagem estomática, foram confeccionadas lâminas da parte abaxial das folhas.

Foram preparadas três lâminas por folha, em um total de 12 repetições por tratamento para cada biótipo. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. As lâminas para a contagem dos estômatos foram preparadas com a aplicação de esmalte incolor na superfície foliar abaxial.

Após a secagem do esmalte, uma fita adesiva foi colocada na mesma superfície e retirada em seguida com um “negativo” da epiderme foliar, que foi separada da fita com o auxílio de uma pinça. O “negativo” da epiderme foi então colocado sobre uma lâmina de vidro, com adição ou não de gotas de glicerina.

Para a visualização dos estômatos, a leitura das lâminas foi realizada utilizando-se microscópio óptico (Olympus® modelo CX31), e o registro fotográfico foi realizado com

câmera AxioCam ERc5s – ZEISS, e foram tomadas no mínimo quatro leituras em cada lâmina. Após a obtenção dos dados, os mesmos foram aplicados à fórmula para determinação da densidade estomática (mm^2), proposta por

$$D = N^{\circ}/0,272902$$

Onde:

D= densidade estomática

N^o= número de estômatos por área conhecida (1cm^2)

Após a quantificação da densidade estomática os dados foram submetidos a análise de variância e havendo significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de probabilidade de erro.

Contagem cromossômica

Para a citológica visando a confirmação do nível de ploidia utilizaram-se pontas de raízes em crescimento, as quais foram obtidas a partir da germinação prévia de sementes em mistura de substrato mais vermiculita. Foram coletadas seis repetições de cada biótipo, onde cada repetição continha 10 pontas de raízes. As raízes apresentavam comprimento entre 0,5 – 1,0 cm, as quais foram pré – tratadas em água destilada a 4°C durante 24 horas. Após as mesmas foram fixadas em Carnoy (3:1), durante 24 horas a temperatura ambiente e após estocados em álcool 70% a -20°C até o momento de uso.

Para o preparo das lâminas as mesmas foram lavadas em água destilada por duas vezes num tempo de 5 minutos cada. Após foram secas em papel filtro. Em um recipiente vedado foram pré aquecidas 5 gotas de HCl 1 N e posteriormente depositadas as raízes dentro e deixado em estufa por 10 min a 60°C. Posteriormente foram lavadas duas vezes em água destilada por 5 min cada e secas novamente com papel filtro. Após foram adicionadas sobre as raízes 2 gotas de corantes Feulgen e deixadas por 40 min no escuro.

Em seguida as raízes foram colocadas sobre lâminas e com auxílio de um bisturi, as mesmas foram cortadas/maceradas adicionando-se carmim acético 1% como corante secundário. Após foi retirado o material em excesso e colocada a lamínula e vedada a lâmina com luto.

As análises foram realizadas nas células cujos cromossomos apresentavam-se completamente espalhados e bem condensados, em microscópio ótico com aumento de 1000X. As imagens foram registradas no computador através do programa PixelView, com aumento de 1000X. Após seguiu-se a contagem do número de cromossomos.

5.4 Resultados e Discussão

Análise de crescimento

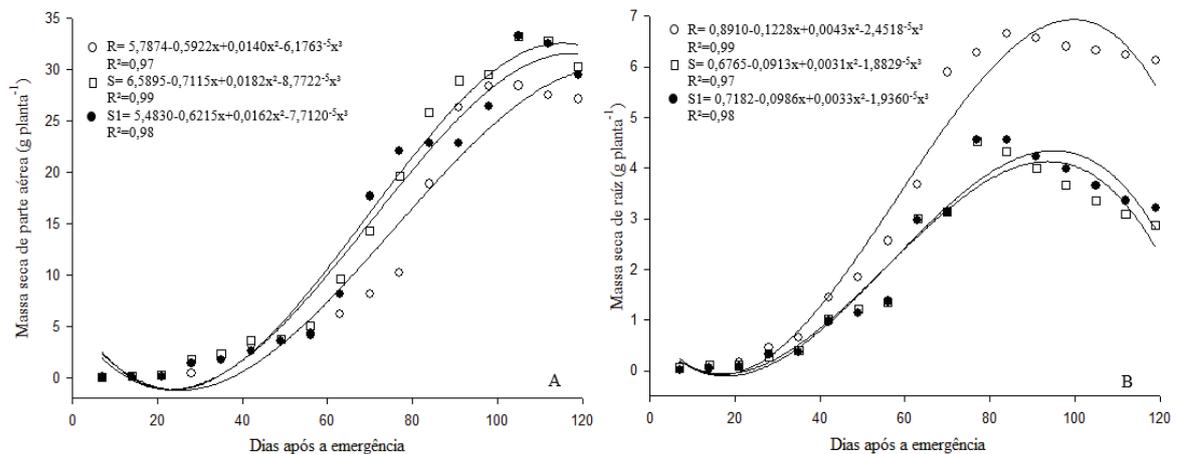
Constatou-se que, independentemente do biótipo utilizado, a curva que melhor ajustou-se aos dados de acúmulo de massa seca de parte aérea, radicular e total de flor - roxa, e que conseguiu levar em consideração o fenômeno biológico de desenvolvimento foi a exponencial de declínio de quatro parâmetros (Figuras 11 e 12).

O acúmulo de massa seca de parte aérea até o início da emissão das hastes para suporte das inflorescências foi similar para ambos os biótipos estudados (Figura 11 A). Após este período ocorreram mudanças em relação ao desenvolvimento da parte aérea para ambos os biótipos, onde observou-se maior incremento de desenvolvimento de parte aérea para os biótipos S1 e S2 quando comparados com o biótipo R. Isso indica resposta mais rápida de desenvolvimento de parte área para os biótipos sensíveis. Ao mesmo tempo pode-se relacionar como sendo uma possível ação de defesa desses biótipos pois eles tendem a se desenvolver mais rapidamente para conseguir perpetuar a espécie.

Ao observar o desenvolvimento do sistema radicular dos biótipos percebe-se que tanto o resistente quanto os suscetíveis, permaneceram com crescimento similar até aproximadamente 30 dias após a emergência (Figura 11 B). Após isso o biótipo R desenvolveu-se mais rapidamente, com acúmulo aos 100 dias de aproximadamente 7

gramas de massa seca raiz por planta (Figura 11 B). Esse maior desenvolvimento pode ser uma das possíveis respostas que auxiliem na compreensão de sobrevivência do biótipo R no campo, pois apresenta um sistema radicular mais agressivo, quando comparado com os demais biótipos e portanto quando em condições de estresse apresenta maior área superficial para realizar absorção de nutrientes e água do solo.

Figura 11 - Acumulo de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) ao longo do desenvolvimento de *Echium plantagineum* para os biótipos resistente (R), suscetível 1 (S1) e suscetível 2 (S2). Passo Fundo - RS, 2019.



Fonte: Dados do Autor

A quantificação da massa seca em experimentos que avaliam o comportamento de espécies é um parâmetro importante, porque demonstra o incremento de massa seca por unidade de área e por unidade de tempo, sendo classificada como produtividade primária líquida (COSTA et al. 2008). A quantificação da massa seca de uma espécie em um menor espaço de tempo possível demonstra maior capacidade da planta quando em competição (RADOSEVICH et al., 2007).

Em estudos realizados com *Echinochloa crusgalli* mostrou não haver diferenças significativas para o acumulo de massa seca para acessos resistentes e suscetíveis a inibidores da ALS herbicidas, assim como inibidores de FSII e carotenóides, mesmo quando comparada com a capacidade competitiva (MUTHUKUMAR et al. 2011). Contudo para o presente estudo, pode se afirmar que há diferenças em relação ao

comportamento de acúmulo de MS de raiz entre os biótipos R e S1 e S2, visto que a curva do biótipo R começa a se distanciar dos demais biótipos aproximadamente aos 40 DAE (Figura 11 B).

A massa seca radicular, engloba maior desenvolvimento do sistema radicular em relação ao de parte aérea do biótipo R, por sua vez pode ser indicativo desse biótipo sobreviver a aplicação de múltiplas doses do herbicida metsulfurom metílico. Comparando-se o desenvolvimento do sistema radicular via imagens é possível constatar que desde aos 21 DAE o sistema radicular do biótipo R apresenta-se mais agressivo do que dos biótipos sensíveis, com maior desenvolvimento tanto em comprimento quanto em formação de novas radículas (Figura 12).

Vale a pena mencionar que o aumento do sistema radicular está diretamente relacionada com o acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas, devido a uma maior resposta das raízes perante ao desenvolvimento das plantas e da fixação carbono fotossintético (AGUIAR et al., 2011).

A diferença com base no desenvolvimento do sistema radicular entre os biótipos pode indicar o porque o biótipo R tende a sobreviver após a aplicação dos herbicidas do mecanismo ALS. Essa alteração de maior incremento de raízes aos 63 DAE indica a resposta evolutiva do biótipo, visto que tal biótipo R apresenta maior quantidade de radículas e pontas de raízes por sua vez.

Figura 12 - Sistema radicular de plantas de *Echium plantagineum* analisadas pelo software Whinrizo, para os biótipos resistentes (R) e suscetíveis (S1 e S2), aos 21 e 63 dias após a emergência (DAE)

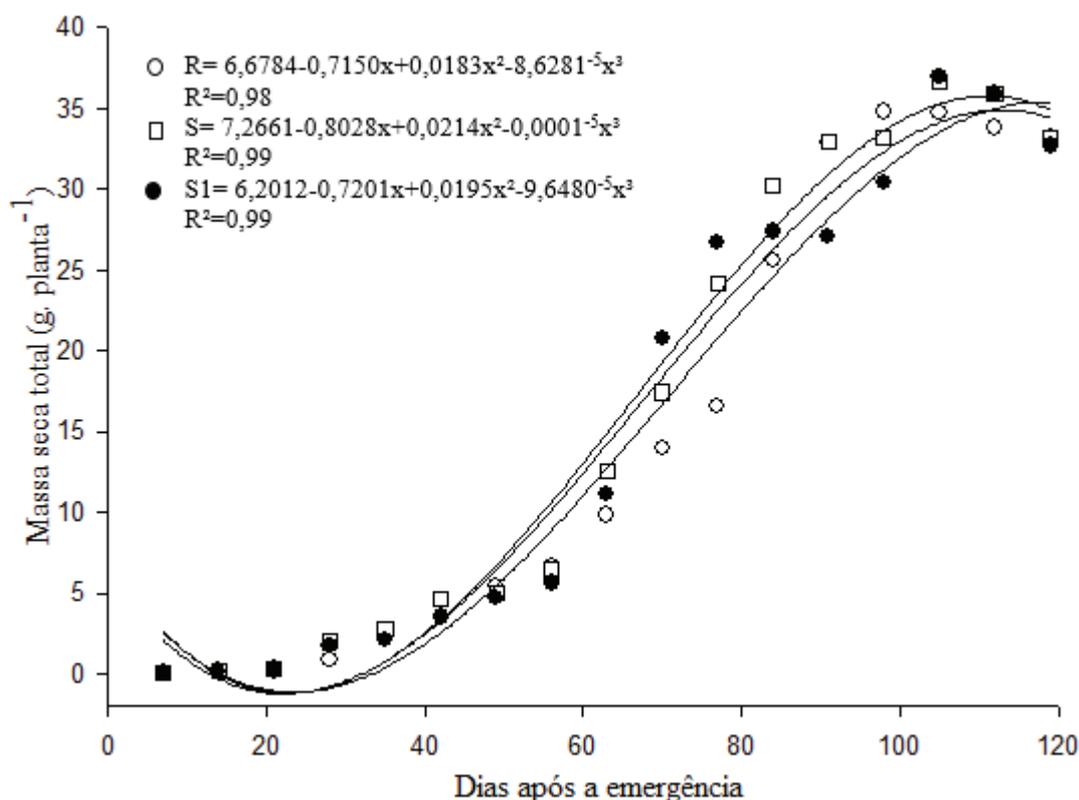


Legenda: Biótipo R (A- 21 DAE, D- 63 DAE), Biótipo S1 (B- 21 DAE, E- 63 DAE), biótipo S2 (C- 21 DAE, F- 63 DAE).

Fonte: Dados do Autor

A produção de MST dos biótipos avaliados comportou-se de forma similar a produção de MSPA (Figura 13). Esse comportamento de acumulo similar entre MST e MSPA está relacionado que o maior incremento de massa seca fica a cargo do desenvolvimento da parte aérea da planta (folhas e hastes), isso explica o porquê da similaridade entre as curvas.

Figura 13 - Acumulo de massa seca total (MST) ao longo do desenvolvimento de *Echium plantagineum* para os biótipos resistente (R), suscetível 1 (S1) e suscetível 2 (S2). Passo Fundo - RS, 2019.



Fonte: Dados do Autor

O comportamento da MST é justificado pela influência direta da área foliar no crescimento da planta, pois a superfície foliar capta a radiação fotossinteticamente ativa e a converte na produção de massa seca (AUMONDE et al., 2013).

Segundo o trabalho realizado por Sathasivan e colaboradores (1990), a semelhança de crescimento em diferentes biótipos podem ocorrer devido ao mecanismo de resistência a inibidores da ALS podendo estar relacionado com alguma mutação específica e, portanto, não apresenta desvantagem no crescimento da planta resistente. Todavia no presente estudo, esse comportamento difere do que foi relatado pelos autores, pois os

biótipos de flor – roxa estudos não apresentam semelhança quanto ao seu desenvolvimento e acúmulo de massa seca.

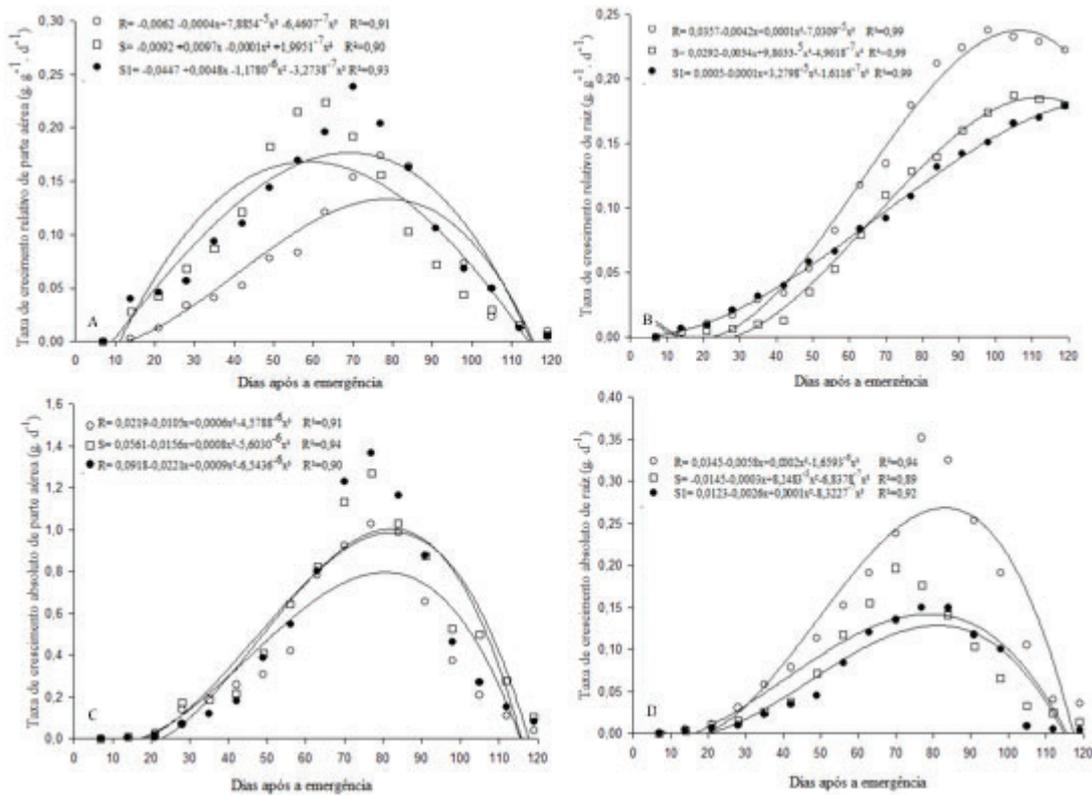
A partir dos dados gerados constatou-se interação significativa para as variáveis analisadas de TCR e TCA para o desenvolvimento de parte aérea e sistema radicular (Figuras 14 A, B, C, D). Para ambos os casos analisados é possível perceber que inicialmente as plantas apresentaram crescimento mais acelerado até aproximadamente 40 DAE e posteriormente fica constante e/ou decresce (Figuras 14 A e 14 C).

Avaliando-se o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular o mesmo ficou mais expressivo a partir de aproximadamente 50 DAE, e a partir desse momento começou a ter ganhos de incremento lineares até aproximadamente 80 DAE (Figuras 14 B).

A TCR reflete o aumento da massa seca da planta, ou qualquer órgão desta, num intervalo de tempo, sendo função do tamanho inicial, ou seja, do material pré-existente, havendo tendência de diminuição da TCR, com a idade da planta (FALQUETO et al. 2009). Já a TCA reflete a variação ou o incremento de crescimento entre duas amostragens, ao longo do período (BENINCASA, 2003).

De maneira geral as diferenças de crescimento entre biótipos podem afetar a persistência e a frequência de biótipos resistentes a herbicidas, em que a redução da aptidão ecológica e reprodutiva irá resultar na redução da sua frequência sob a ausência de seleção de pressão causada pelo herbicida (TRAVLOS e CHACHALIS 2013).

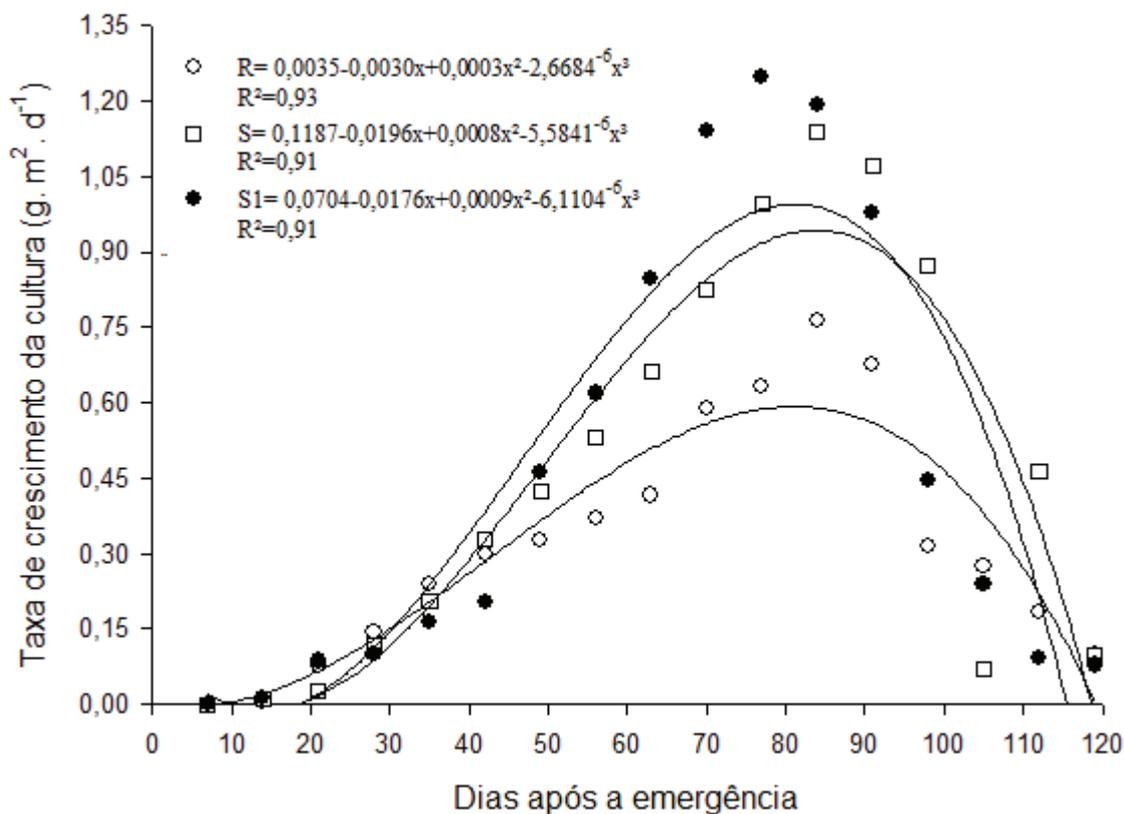
Figura 14 - Taxa de crescimento relativo de parte aérea (TCRPA) ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), taxa de crescimento relativo de raiz (TCRR) ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), taxa de crescimento absoluto de parte aérea (TCAPA) ($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$), taxa de crescimento absoluto de raiz (TCAR) ($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) de biótipos resistente (R), suscetível (S1 e S2) de *Echium plantagineum* ao longo de seu ciclo de desenvolvimento.



Legenda: A- taxa de crescimento relativo de parte aérea. B- taxa de crescimento relativo de raiz. C- taxa de crescimento absoluto de parte aérea. D- taxa de crescimento absoluto de raiz.
Fonte: Dados do Autor

Com base nas respostas obtidas entre os distintos biótipos observou-se que ambos apresentam em sua fase inicial de desenvolvimento um baixo incremento quanto a taxa de crescimento de cultura (TCC) (Figura 15).

Figura 15 - Taxa de crescimento da cultura (TCC) de biótipos resistente (R) e suscetível (S1 e S2) de *Echium plantagineum* ao longo de seu ciclo de desenvolvimento.



Fonte: Dados do Autor

Aos 40 DAE foi a época em que os biótipos começaram a expressar seu desenvolvimento, visto que os maiores acúmulos com base na TCC ficaram a cargo dos biótipos suscetíveis (S1 e S2) (Figura 15). O lento crescimento inicial é uma característica que pode afetar na competição com outras espécies daninhas (MACHADO, 2006). Nesse sentido, no início de desenvolvimento as plantas de EHIPL podem ser suprimidas pelo desenvolvimento mais rápido de outras espécies da comunidade infestante.

Avaliando-se a produção de TCC aos 80 DAE observou-se a maior diferença entre o biótipo R e os biótipos S e S2 onde o acúmulo de MS em g. g. d⁻¹ nos três casos foi 0,58; 0,98 e 0,92 respectivamente (Figura 15). Isso por sua vez indica que há maior dominância dos biótipos sensíveis sobre o resistente no presente estudo, o que pode ficar implícito

que os biótipos sensíveis são capazes de ocupar antes o espaço e assim competir com o resistente, suprimindo o desenvolvimento do biótipo R.

Produção de sementes

A produção de sementes é um dos fatores determinantes na compreensão de como os processos de resistência são impactados ao longo do ciclo de vida das plantas daninhas resistentes e suscetíveis (VILA-AIUB et al., 2009) e como podem ser empregados estes conhecimentos para reduzir o aumento de espécies resistentes a herbicidas (BONOW et al., 2018).

A produção de sementes no biótipo R foi menor, do que com os biótipos S1 e S2, o mesmo foi observado para o peso de mil sementes (PMS) (Tabela 5). Essa maior expressão dos biótipos S1 e S2 em produzir sementes podem garantir maior capacidade adaptativa, visto que conseguem ocupar o local primeiro, desde que a sua germinação seja mais rápida que os biótipos resistentes.

Do ponto de vista prático, a menor capacidade de produção do biótipo resistente, favorece a disseminação dos biótipos suscetíveis os quais por vez ocupam o nicho ecológico (BONOW et al., 2018). Visto que o biótipo R produz menos sementes e germinar entorno de 3 dias após que os suscetíveis (Dados não mostrados), o que garante a permanência do mesmo no ambiente é a sua maior produção de raízes. Esse fato observado justifica a adaptabilidade do biótipo R sobre os biótipos S1 e S2.

Para *Echinochloa crusgalli* verificou-se que o biótipo sensível foi superior em relação a produção de sementes quando comparado com o biótipo resistente (BONOW et al., 2018), esses resultados são similares àqueles observados para flor-roxa. Os autores ainda afirmaram que o conhecimento dos custos de adaptabilidade para uma planta é essencial, o que por sua vez visa estabelecer estratégias de manejo que tenderão a impedir a reprodução e a difusão de espécies resistentes a herbicidas.

Tabela 5 - Número de sementes por planta e peso de mil sementes (PMS) de *Echium plantagineum* resistente (R) e suscetíveis (S1 e S2), ao herbicida metsulfurom metílico

Biótipo	Sementes/planta	PMS (gr)
R	806 b	0,482 b
S1	1038 a	0,551 a
S2	1074 a	0,582 a
DMS	4,02	0,085
CV (%)	4,34	7,52

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferenciam entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ** Coeficiente de variação.

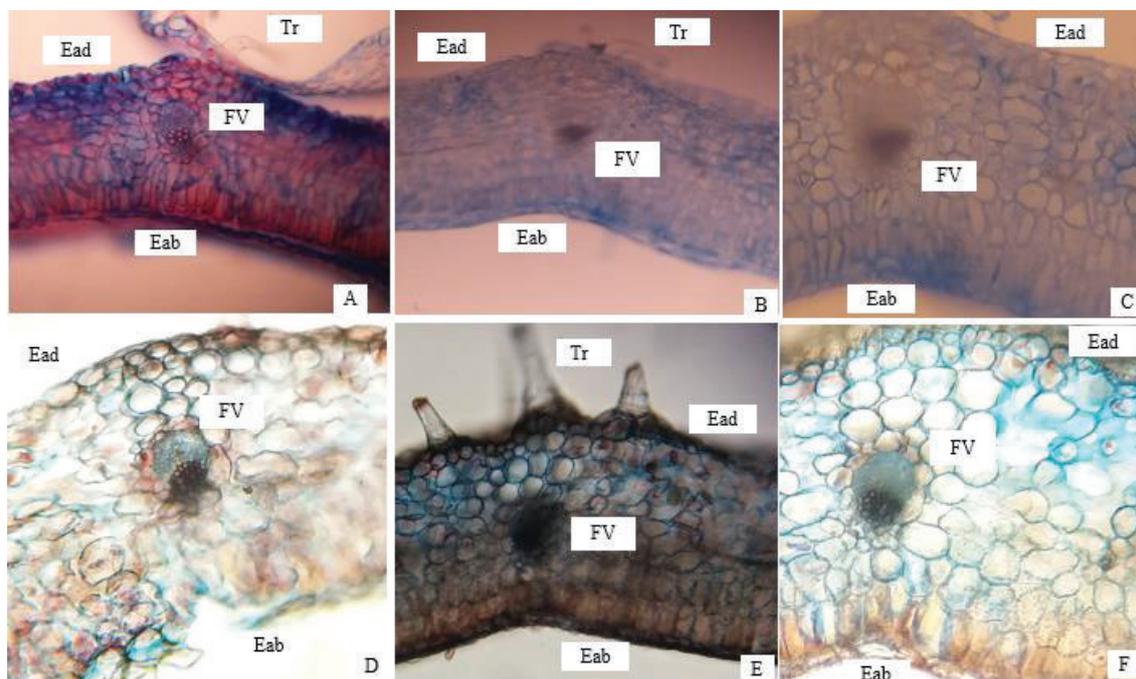
Fonte: Dados do Autor

A menor expressão, em relação a produção de sementes de um biótipo R dá indícios de que a frequência dos alelos nesta população irá permanecer sem alterações na ausência de seleção imposta pelo herbicida (BONOW et al., 2018). Essa afirmação é esclarecida pelo fato de que a frequência alélica ao longo dos anos para biótipos resistentes a enzima ALS é altamente dependente do ambiente, local, misturas entre espécies, da taxa e quantidade de fluxo de genes de plantas localizadas em culturas e populações consideradas selvagens (MASSINGA et al., 2005).

Caracterização anatômica das folhas e raízes

As análises anatômicas das folhas e raízes mostraram não haver diferenças estatísticas na caracterização da epiderme adaxial e do diâmetro dos feixes vasculares (Figuras 16 e 17). Observando-se a composição das estruturas celulares e vasculares nas raízes para os biótipos de *E. plantagineum* resistente e suscetíveis ao herbicida metsulfurom metílico, entre os biótipos avaliados (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Cortes transversais da folha dos biótipos de flor-roxa (*Echium plantagienum*) resistente (A, D), suscetível 1 (B, E) e suscetível 2 (C, F) ao herbicida metsulfurom metílico, aos 14 dias após a emergência (DAE) e em floração plena



Legenda: Ead epiderme da face adaxial. Eab epiderme da face abaxial. FV feixes vasculares (compreende o xilema - células maiores; e floema - células menor). Tr tricomas. Aumento 400x.

Fonte: Dados do Autor

As características da superfície foliar, bem como do mesofilo e tecidos vasculares, podem afetar a eficácia da absorção de herbicidas em plantas daninhas, pela sua influência na retenção e absorção do herbicida na folha (HUANGFU et al., 2009). A epiderme caracteriza-se por ser o tecido mais externo dos órgãos vegetais, tendo como principal função o revestimento dos demais tecidos, evitar a perda de água, além de proteger da ação de danos mecânicos e patógenos, sendo porta de entrada de agroquímicos para o interior da planta (KRAEHMER; BAUR, 2013). Características da superfície da folha, como cutícula (cera epicuticular, cutina e pectina), ângulo e posição da folha, número de estômatos, tricomas e glândulas, interferem na absorção foliar de herbicidas (HUANGFU et al., 2009).

Outro importante constituinte celular a se observar são as células da epiderme, pois é a primeira camada celular a ser alcançada depois de iniciado o processo de absorção

do herbicida. Diante deste fato, está a importância em se conhecer a espessura deste conjunto de células, pois podem afetar diretamente na absorção dos herbicidas, e consequentemente diminuir assim, a sua eficiência. Após ocorrido o processo de absorção, pelas células da epiderme, e o mesmo for lento, apresentar demora para o produto chegar até as demais células da planta, feixes vasculares, possivelmente irá ocorrer o processo de inativação nas células epidérmicas (VELINI et al., 2009). As células epidérmicas caracterizam-se por estarem justapostas umas às outras e por não proporcionar espaços intercelulares. Esta característica é de grande importância, devido à função da epiderme de perder água e ao mesmo tempo, a absorção do herbicida obrigatoriamente necessita atravessar a epiderme (APEZZATO DA GLORIA; CARMELO-GUERREIRO, 2004).

Quando se fala em sistema radicular de biótipos que apresentam e não apresentam resistência a herbicidas, é importante visualizar a sua composição e caracterização a fim de conseguir retirar informações se pode ou não haver diferenças entre os biótipos e essas por sua vez podem alterar alguma ação dos herbicidas e possam contribuir para a resistência.

Figura 17 - Cortes transversais de raiz dos biótipos de flor-roxa (*Echium plantagenum*) resistente (A), suscetível 1 (B) e suscetível 2 (C) ao herbicida metsulfurom metílico, aos 14 dias após a emergência (DAE)



Legenda: Ed epiderme. E exoderme. F floema. X xilema. Pc parênquima cortical. Aumento 400x.
Fonte: Dados do Autor

Através das imagens pode-se perceber que não há alterações visíveis nas estruturas das células da epiderme, parênquima cortical, xilema e floema, assim como não há diferenças estatísticas para ambas as estruturas citadas (dados não apresentados) (Figura 17).

Em trabalho realizado com *Lolium multiflorum* resistente e suscetível ao herbicida glifosato os autores constataram haver lise das células do parênquima cortical, desorganização da epiderme e exoderme além de maior espessamento da endoderme das células do cilindro vascular no biótipo sensível (RUCHEL et al., 2015). Cabe salientar que tal herbicida não é absorvido pelas raízes o que por sua vez, conforme os autores mencionam as modificações verificadas no sistema radicular não interferem diretamente na resistência dos biótipos ao herbicida.

O mesmo é válido para o presente estudo, onde a não presença de diferenças estatísticas mostra que para os biótipos de flor-roxa estudados não há evidências de alterações quanto aos padrões de desenvolvimento das raízes para as épocas avaliadas. Em capim-arroz resistente ao herbicida quinclorac, o biótipo resistente apresentou maior proporção de mesofilo em comparação ao suscetível, tanto na ausência quanto na presença do herbicida (FERREIRA et al., 2012).

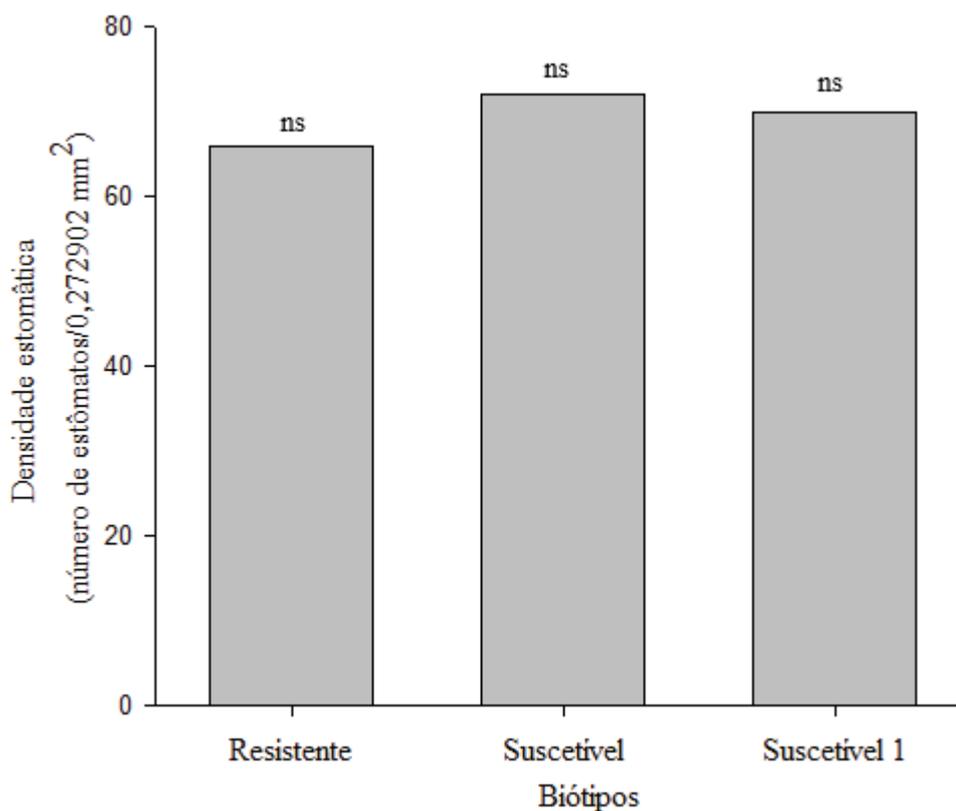
Essas informações representam que cada população se comporta de maneira distinta perante a situações de aplicações ou não de herbicidas, e que sendo utilizadas de forma isolada não podem servir para dar indícios de possíveis resistências de plantas daninhas a herbicidas.

Análise estomática

Outro importante constituinte da estrutura foliar a se compreender é a quantidade de estômatos presentes nas espécies.

A partir dos dados observou-se não haver diferença significativa para a densidade estomática entre os biótipos R, S1 e S2, os quais apresentaram densidade de 66, 71 e 72 respectivamente (Figuras 18 e 19).

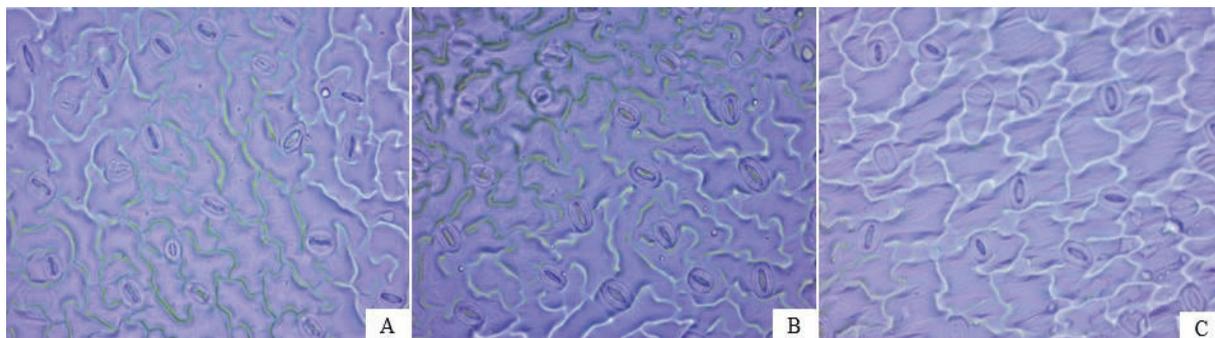
Figura 18 - Densidade estomática em biótipos Resistente (R) e Suscetíveis (S1 e S2) de *Echium plantagineum*, ao herbicida metsulfurom metílico



Fonte: Dados do Autor

Quando uma planta é submetida a algum tipo de estresse biótico ou abiótico esses afetam o desenvolvimento e funções vitais das plantas. Quando uma planta é submetida a algum tipo de estresse a mesma tenta alterar as suas conformações morfoanatômicas e a estabilidade nas reações enzimáticas, afim de tentar se manter viável e ativa durante o período de estresse (KAHLON et al., 2002).

Figura 19 - Imagens microscópicas de biótipos de *Echium plantagineum* Resistente e Suscetíveis ao herbicida metsulfurom metílico



Biótipo R – resistente (A)

Biótipo S1 - suscetível (B)

Biótipo S2 Suscetível (C)

Aumento 400x

Fonte: Dados do Autor

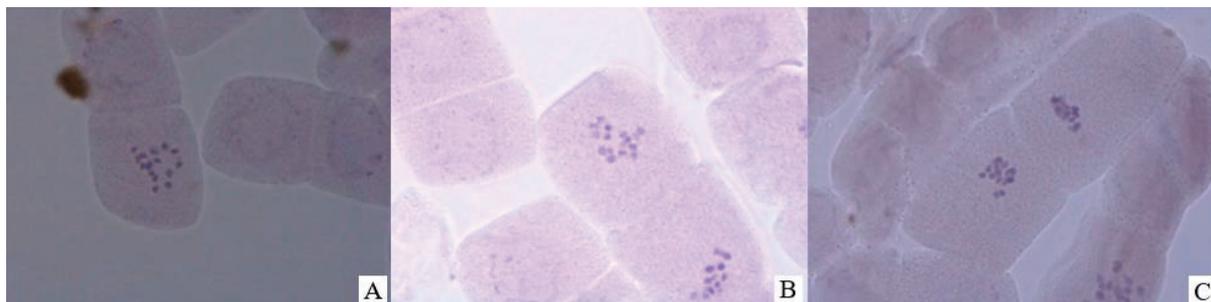
Os estômatos por desempenham função vital de regulação da temperatura interna da célula, os quais contribuem para a manutenção das funções de uma planta. Pois, auxiliam no processo transpiratório é o resfriamento foliar, garantindo abertura estomática para entrada de CO₂ e manutenção da fotossíntese (BULEGON et al., 2016).

Análise cromossômica

Avaliando-se o número de ploidia dos biótipos resistente e suscetíveis da espécie *E. plantagineum*, constatou-se que o número de cromossomos foi $2n= 16$ para ambos os biótipos estudados (Figura 20). Este resultado está de acordo com o número cromossômico determinado por BRITON, 1951.

O conhecimento sobre os padrões cromossômicos de EHIPL constitui um obstáculo para detecção da resistência da espécie, sendo imprescindível sua caracterização para poder entender o comportamento da espécie

Figura 20 - Metáfase mitótica de biótipos resistente e suscetíveis da espécie *Echium plantagineum*



Biótipo R – resistente (A)

Biótipo S1 – suscetível (B)

Biótipo S2 - Suscetível (C)

Aumento 400x

Fonte: Dados do Autor

De forma geral, as plantas tendem a desenvolver poliploidia como o principal mecanismo evolutivo, atuando na diversificação de linhagens específicas (SCHIFINO-WITTMANN 2004). Entretanto, os dados gerados neste trabalho sugerem que os diferentes biótipos de EHIPL, tem mostrado consistência genética quanto ao número cromossômico e que os biótipos estudados não tem desenvolvido poliploidia. Assim, este resultado representa uma importante contribuição para o entendimento cromossômico da espécie.

5.5 Conclusões

Afirma-se que entre as populações resistente e suscetível de *E. plantagineum* ocorrem diferenças quanto ao comportamento em relação ao crescimento e desenvolvimento de plantas, em especial no acúmulo de massa seca.

Com relação as características morfoanatômicas, número de estômatos e ploidia da espécie não ocorrem diferenças entre os biótipos estudados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência de plantas daninhas a herbicidas ser exemplo da evolução das espécies em resposta a uma rápida mudança ocorrida no ambiente ou mesmo por alguma adversidade, como no caso pela ação exercida através da aplicação sucessiva de um mesmo herbicida por longos períodos.

Essa é uma resposta que intrinsecamente já está presente nas populações de plantas, sendo que a mesma será potencializada quando se utilizar um agente selecionador, como no caso um herbicida. A exemplo dessa situação existem plantas de flor – roxa que apresentam resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase ALS, apresentando também resistência cruzada a quatro classes dos herbicidas inibidores da ALS.

Uma importante relação ao se estudar populações resistentes é investigar se as alterações são provenientes de mudanças estruturais das espécies ou se pode haver algum tipo de alteração metabólica a nível de enzima que possa estar conferindo a resistência. Houve resposta em relação a alterações metabólicas no biótipo R uma vez que ocorreu alterações nos parâmetros cinéticos da enzima, o que caracteriza baixa afinidade do substrato (piruvato) pela enzima e maior $V_{m\acute{a}x}$ nas populações resistentes.

Quanto as alterações morfoanatômicas de diferentes espécies é importante considerar que os biótipos sejam estudados no mesmo local para não haver interferência de fatores externos, os quais podem mudar por exemplo a espessura da parede celular. Para os biótipos de flor – roxa estudados há variações em relação as taxas de crescimento e desenvolvimento da cultura, o que por sua vez sugerem alterações quanto a adaptação dos diferentes biótipos no meio. Todavia é de extrema importância correlacionar o desenvolvimento desses biótipos em situações de estresse e de convivência com a cultura

durante todo o seu ciclo. Sendo assim, estudos complementares devem ser realizados para tal situação.

Visto que se tendo o relato de mais uma espécie que apresenta resistência a herbicidas, é de extrema importância adotar práticas de manejo da resistência. Visto que o manejo de resistência de plantas daninhas é complexo Beckie e Harker (2017) descreveram as dez melhores práticas de manejo de resistência em plantas daninhas, as quais fazem menção a 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 herbicida, misturas de herbicidas, 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.

7 CONCLUSÃO GERAL

O biótipo R de flor - roxa apresenta resistência cruzada aos herbicidas de diferentes grupos químicos dos inibidores da ALS. Avaliando-se o bioexperimento *in vitro* para a enzima ALS o biótipo R é resistente ao herbicida imazapic, os biótipos S1 e S2 são altamente suscetíveis. Constata-se que ocorreu alteração nos parâmetros cinéticos da enzima, onde se tem uma menor afinidade do substrato pela enzima e maior V máx na população resistente. Há envolvimento do complexo citocromo P450 monooxigenase na resistência de flor - roxa aos herbicidas inibidores da ALS, visto que o biótipo R é controlado quando há aplicação de malathion 30 minutos antes da aplicação do herbicida metsulfurom-metílico. Além ocorrem diferenças quanto ao seu comportamento em relação ao crescimento e desenvolvimento de plantas. Já os três biótipos (R, S1 e S2) não diferem em relação as características morfoanatômicas.

REFERÊNCIAS

AGOSTINETTO, D.; VIDAL, R. A.; FLECK, G. N.; RIZZARDI, M. A. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da enzima Acetil coenzima A carboxilase (ACCase). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 3, n. 2, p. 155 – 161, 2002.

AGUIAR, F.A., KANASHIRO, S., TAVARES, A., RODRIGUES, T. Crescimento de mudas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), submetidas a cinco níveis de sombreamento. **Revista Ceres**, v. 58, n. 6, p.193-205, 2011.

AGUILERA, D. B., FERREIRA, F. A., CECON, P. R. Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de iluminação. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1 p. 43-51, 2004.

AHMAD-HAMDANI, M. S., YU, Q., HAN, H., CAWTHRAY, G. R., WANG, S. F., POWLES, S. B. Herbicide resistance endowed by enhanced rates of herbicide metabolism in wild oat (*Avena* spp.). **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 55-62, 2013.

ALVAREZ, R. de C. F., CRUSCIOL, C. A. C., Nascente, A. S. Análise de crescimento e produtividade de cultivares de arroz de terras altas dos tipos tradicional, intermediário e moderno. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 4, p. 397-406, 2012.

ANTONIAZZI, N. e DESCHAMPS, C. Análise de crescimento de duas cultivares de cevada após tratamentos com elicitores e fungicidas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1065-1071, 2006.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 1. Ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

ASHIGH J., TARDIF F. An Ala205 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.

AUMONDE, T. Z., PEDÓ, T., MARTINAZZO, E. G., MORAES, D. M., VILLELA, F. A., LOPES, N. F. Análise de crescimento e partição de assimilados em plantas de maria-preta submetidas a níveis de sombreamento. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 99-108, 2013.

BATISTA, M. S. Diferenças no metabolismo das plantas que determinam resistência ao glyphosate em *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista de Ilha Solteira, 2016, 48 f.

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.; WARWICK, S. I.; SAUDER, C. A. Acetolactate synthase (ALS) inhibitor-resistant wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*) in alberta. **Weed Technology**, v. 26, n. 1, p. 156-160, 2012.

BENICASA, M. M. P. *Análise de crescimento de plantas: Noções Básicas*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2003.

BRAIN, P. e COUSENS, R. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. **Weed Research**, v.29, n. 2, p.93-96, 1989.

BRITTON, D. M. Cytogenetic studies on the Boraginaceae. **Brittonia**, v. 7, n. 4, p. 233 – 266, 1951.

BROSNAN, J. T., VARGAS, J. J., BREEDEN, G. K., GRIER, L., APONTE, R. A., TRESCH, S., LAFOREST, M. A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 243, n. 1, p. 149-159, 2016.

BONOW, J. F. L., LAMEGO, F. P., ANDRES, A., AVILA, L. A., TELÓ, G. M., EGEWARTH, K. Resistance of *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* to imazapyr+imazapic herbicide and alternative control in irrigated rice. **Planta Daninha**, v. 36, p. 1 – 11, 2018.

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.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; EGEWARTH, V. A.; SANTOS, M. G.; HELING, A. L.; FERREIRA, S. D.; WENGRAT, A. P. G. S.; BATTISTUS, A. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Nativa**, v. 4, n. 5, p. 277-286, 2016.

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

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 Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 299-306, 2017.

CHIPMAN D., BARAK Z., SCHLOSS J. Biosynthesis of 2-Aceto-2-Hydroxy Acid; Acetolactate Synthases and Acetohydroxyacid Synthases. **Biochim Biophys Acta-Protein Struct Mol Enzymol**, v.1385, n.2, p.401-419, 1998.

CHRISTTOFOLETTI, 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.; MEDEIROS, D.; MONQUEIRO, P. A.; PASSINI, T. Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.) *Soja: tecnologia da produção*. Piracicaba: ESALQ, 2000. p. 179-202.

CHRISTOFFOLETI, P.J. e LÓPEZ-OVEJERO R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.21, n.3, p.507-515, 2003.

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*. 3. ed., Piracicaba: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008, p. 9-34.

CONCENÇO, G. I., ASPIAZÚ, I., GALON, L., FERREIRA, E. A., FREITAS, M. A. M., FIALHO, C. M. T., SCHWANKE, A. M. L., FERREIRA, F. A., SILVA, A. A. Photosynthetic characteristics of hybrid and conventional rice plants as a function of plant competition. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 803-809, 2011.

COSTA, J. R. da., PINHO, L. N. de., PARRY, M. M. Produção de matéria seca de cultivares de milho sob diferentes níveis de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 5, p. 443-450, 2008.

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.

DAL MAGRO, T.; REZENDE, S. T.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; SILVA, A. A.; FALKOSKI, D. L. Propriedades enzimáticas da enzima ALS de *Cyperus difformis* e mecanismo de resistência da espécie ao herbicida pyrazosulfuron-ethyl. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2439-2445, 2010.

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.

DARMENCY, H., COLBACH, N., Le CORRE, V. Relationship between weed dormancy and herbicide rotations: implications in resistance evolution. **Pest Management Science**, v. 73, n. 10, p. 1994-1999, 2017.

DEVINE, M. D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v. 19, p. 881-889, 2000.

DÉLYE, C., JASIENIUK, M., LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, n.11, p. 1-10, 2013.

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. e PANG S. Acetohydroxyacid synthase. **Jounal Biochemiche Molecul Biology**, v.33, n. 1, p.1-36, 2000.

EBERLEIN C., 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.

FALQUETO, A. R., CASSOL, D., MAGALHÃES, A. M. de J., OLIVEIRA, A. D. de; BACARIN, M. A. Partição de assimilados em cultivares de arroz diferindo no potencial de produtividade de grãos. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 453-461, 2009.

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

FERREIRA, E. A., PROCÓPIO, S. O., SILVA, E. A. M., SILVA, A. A., RUFINO, R. J. N. estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas. II - *Bidens pilosa*, *Emilia sonchifolia*, *Ageratum conyzoides* E *Sonchus asper*. **Planta Daninha**, v.20, n.3, p.327-335, 2002.

FERREIRA, E. A., CONCENÇO, G., GALON, L., DELGADO, M. N., ASPIAZÚ, I., SILVA, A. F. da., FERREIRA, F. A., MEIRA, R. M. S. A. Características micromorfológicas de biótipos de capim-arroz resistente e suscetível ao quinclorac. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p.1048-1056, 2012.

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

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.

GOMES JÚNIOR, F. G. E CHRISTOFFOLETI, P. J. Biologia e manejo de plantas daninhas em área de plantio direto. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 789-798, 2008.

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

HAN, H., YU, Q., PURBA, E., WALSH, M., FRIESEN, S., POWLES, S. B. A novel amino acid substitution Ala-122Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 68, n. 3, p. 1164-1170, 2012.

HARTWING, I., BERTAN, I., GALON, L., NOLDIN, J. A., CONCENÇO, G., SILVA, A. F., ASPIAZÚ, I., FERREIRA, E. A. TOLERÂNCIA de trigo (*Triticum aestivum*) e aveia (*Avena* sp.) a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 361 – 368, 2008.

HEAP, I. M. Identification and documentation of herbicide resistance. **Phytoprotecion**, v 75, n. 4, p. 85 – 90, 1994.

HEAP, I. *International survey of herbicide resistant weeds*. Disponível em: <http://www.weedscience.org/In.asp>. Acesso em: 20 fev. 2019.

HUANGFU, C., XIAOLING, S., QIANG, S. Morphological disparities in the epidermal and anatomical features of the leaf among wild Brassica juncea populations. **Weed Biology Management**, v. 9, n. 3, p. 234-242, 2009.

KAHLAWN, M. A., e AZAM, M. Individual and combined effect of waterlogging and salinity on crop yields in the Indus basin. **Irrigation and Drainage**, v. 51, n. 4, p. 329–338, 2002.

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.

KOSHLAND, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 2324, p. 2375–2378, 1995.

KRAEHMER, H.; BAUR, P. *Weed anatomy*. Frankfurt, Germany: British Library, 2013.

LEITE, C. R. F.; ALMEIDA, J. C. V.; PRETE, C. E. *Aspectos fisiológicos, bioquímicos e agrônômicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS (AHAS)*. Londrina: Edição do autor, 1998. 68 p.

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.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; PENCKOWSKI, L. H.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de populações de capim-colchão (*Digitaria ciliaris*) aos herbicidas inibidores da acetil Co-A carboxilase. **Planta Daninha**, v. 23, n. 3, p. 543-549, 2005.

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.

MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; FIALHO, C. M. T.; TUFFI SANTOS, L. D.; MACHADO, M. S. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 641-647, 2006.

MANLEY, B. S.; WILSON, H. P.; HINES, T. E. Characterization of imidazolinone resistant smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). **Weed Technology**, v. 14, n. 3, p. 575-584, 1998.

MARCHIORO, V. S.; FRANCO, F. A. *Informações técnicas para trigo e triticale - safra 2011*. Cascavel, Coodetec. Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2010. 170 p.

MARIANI, F., VARGAS, L., AGOSTINETTO, D., SILVA, D. R. O., FRAGA, D. S., SILVA, B. M. Herança da Resistência de *Lolium multiflorum* ao Iodosulfuron-Methyl Sodium. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p. 351 – 356, 2015

MARIANI, F., MARGAS, L., AGOSTINETTO, D., FRAGA, D. S., SANTOS, F. M dos; PIESANTI, S. R. Resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio e herbicidas alternativos para o controle. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 115, n.1, p. 35-43, 2016.

MARIANI, F., SENSEMAM, S.A., VARGAS, L., AGOSTINETO, D., ÁVILA, L.A., SANTOS, F.M. Enzymatic properties and ryegrass resistance mechanism to iodosulfuron-methyl-sodium herbicide. **Planta Daninha**, v. 37, p. 1-9, 2019.

MASSINGA, R. A., KASSIM, A. K., PAUL, S. A., JERRY, F. M. Relative fitness of imazamox-resistant common sunflower and prairie sunflower. **Weed Science**, v. 53, n. 2, p. 166-174, 2005.

McCOURT, J. A. e DUGGLEBY, R. G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. **Amino Acids**, v. 31, p. 173–210, 2006.

McCULLOUGH, E. P.; SCOTT MCELROY, Y. J., CHEN, S.; ZHANG, H.; GREY, L. T.; CZARNOTA, A. M. ALS–Resistant Annual Sedge (*Cyperus compressus*) Confirmed in turfgrass. **Weed Science**, v. 64, n. 1, p. 33- 41, 2016.

McELROY, J. S.; FLESSNER, M. L.; WANG, Z.; DANE, F.; WALKER, R. H.; WEHTJE, G. R. A Trp574 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.

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

MONQUEIRO, P. A., CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da Acetolactato Sintase. **Planta Daninha**, v.19, n.1, p.67-74, 2001.

MORRISON, I. N.; BOURGEOIS, L. Approaches to managing ACCase inhibitor resistance in wild oat on the Canadian prairies. In: Cop Protection Conference: Weeds, n. 1., 1995, Brighton. **Anais...** Proceedings of an international conference, 1995, p. 567-576.

MUTHUKUMAR, V. B., JASON K., PRASHANT, J., KENNETH., S. Does Resistance to Propanil or Clomazone Alter the Growth and Competitive Abilities of Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*)? **Weed Science**, v. 59, n. 3, p. 353-358, 2011.

NEVILL, D.; CORNES, D.; HOWARD, S. *Weed resistance: The Role of HRAC in the Management of Weed Resistance*. Pesticide Outlook, 1998. Disponível em: <<http://www.hracglobal.com/Publications/HRACManagementandWeedResistance.aspx>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

OLIVEIRA JR., R. S.; Mecanismo de ação dos herbicidas, In: *Biologia e manejo de plantas daninhas*. OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J. INOUE, M. H. (Eds.). Curitiba, PR: Omnipax, 2011, 348 p.

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

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

PERUZZO, S. T. Resistência de *Echium plantagineum* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). **Dissertação de Mestrado em Agronomia** – Universidade de Passo Fundo, 2016, 110 p.

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

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 Physiology**, v. 84, n. 3, p. 227-235, 2006.

RADOSEVICH, S. R.; HOLT, J. S.; GHERSA, C. M. Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agriculture and natural resource management. 3 ed. New York: Willey, 2007.

RIAR, D. S.; NORSWORTHY, J. K; SRIVASTAVA, V; NANDULA, V; BOND, J. A; SCOTT, R. C. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural Food Chemical**, v. 6, n. 2, p.278–289, 2013.

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.

ROMAN, E. S., VARGAS, L., RIZZARDI, M. A., HALL, L., BECKIE, H., WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia a aplicação**. Passo Fundo, RS, Berthier, 2007. 160p.

RUCHEL, Q., VARGAS, L., AGOSTINETTO, D., FERNANDO, J. A., LÜDTKE, R. e BOBROWSKI, V. L. Caracterização morfoanatómica, contagem cromossômica e viabilidade polínica de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 567-578, 2015.

SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; THILL, D. C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, A. M. **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p. 83–139.

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.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p.151-157, 2004.

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**, v. 44, n. 4, p. 405-411, 1999.

SHIMIZU, E. M., FUJIMONI, T., YNAGISAWA, 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.

SINGH, B. K.; STIDHAM, M. A.; SHANER, D. L. Assay of acetohydroxyacid synthase. **Analytical Biochemistry**, v. 171, n. 1, p. 173-179, 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.

TARDIF, F.J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. **New Phytologist**, v.169, n.2, p.251-264, 2012.

TRANDEL, 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.

TRANDEL, P.J., WRIGHT, T. R e HEAP, I. M. ALS Mutations from Herbicide-resistant Weeds. [Online]. <http://www.weedscience.com> Acesso em 30/06/2019.

TRAVLOS, I. S. e CHACHALIS, D. Relative competitiveness of glyphosate-resistant and glyphosate susceptible populations of hairy fleabane, *Conyza bonariensis*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 2, p. 345-351, 2013.

TUFFI SANTOS, L. D., Meira, R. M. S. A., Santos, I. C., Ferreira, F. A. Efeito do glyphosate sobre a morfologia das folhas e do caule de *Commelina diffusa* e *C. benghalensis*. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1, p. 101-108, 2004.

VELINI, E.D.; MESCHEDI, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. *Glyphosate*. Botucatu: FEPAF, 2009.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v.184, n. 4 751-767, 2009.

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.

WALSH, M. J.; DUANE, R. D.; POWLES, S. B. High frequency of chlorsulfuron-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations across the western Australian wheat belt. **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, 2006.

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.

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.

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

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



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV