

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Caracterização de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam.
resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato
sintase (ALS)**

Franciele Mariani

Pelotas, 2014

FRANCIELE MARIANI

**Caracterização de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. resistentes a herbicidas
inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fitossanidade (área do conhecimento: Herbologia).

Orientador: Dr. Leandro Vargas

Coorientador: Dr. Dirceu Agostinetto

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

(Gabriela Machado Lopes – CRB-10/1842)

M333c Mariani, Franciele

Caracterização de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) / Franciele Mariani; orientador Leandro Vargas; Dirceu Agostinetto, coorientador. - Pelotas, 2014.

112 f. : il.

Tese (Doutorado) Programa de Pós- Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

1. Azevém 2. Iodosulfurom-metílico 3. Resistência 4. Sulfonilureia I. Vargas, Leandro (orientador) II Agostinetto, Dirceu (co-orientador) III.Título.

CDD 633.2

Banca examinadora:

Dirceu Agostinetto, Dr.

Sidnei Deuner, Dr.

Luciano do Amarante, Dr.

Nelson Diehl Kruse, Dr.

Leandro Vargas, Dr.
(Orientador)

Aos meus pais, Sady e Lisane;
Aos meus irmãos, Edinéia e Alisson;
Ao meu noivo Márcio;

OFEREÇO E DEDICO

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, saúde, força, fé, coragem e determinação para seguir esse caminho.

Aos meus pais pela vida e os ensinamentos.

Aos meus irmãos pela amizade e carinho.

Ao meu noivo Márcio que sempre me apoiou e compreendeu todos meus momentos de dificuldades.

Ao professor Leandro Vargas pela orientação, apoio em todos os momentos, conhecimento compartilhado, dedicação, confiança, convivência e amizade.

Ao professor Dirceu Agostinetti, por toda a ajuda e orientação, a todos os seus ensinamentos, conselhos, incentivo, amizade e confiança.

Ao Prof. Luis Antonio Ávila pelo incentivo e ajuda ao doutorado sanduíche.

Ao Dr. Scott Allen Senseman pela orientação e ensinamentos durante o doutorado sanduíche.

A laboratorista Kathy Karson pela dedicação e auxílio durante os trabalhos do doutorado sanduíche.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade pela oportunidade de realização do curso e aos professores que contribuíram para minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A Embrapa Trigo pela disponibilização das suas instalações para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da Embrapa Airton Munz, Felipe Pilger, Everson S. Flores e Odirlei Dalla Costa pela amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação: Ana Claudia Langaro, Claudia Oliveira, Diego Fraga, Rafael Rubin, Camila Peligrinotti Tarouco, Marcos

André Nohatto, André Ulguim, Angela da Cas Bundt, Fernando Martini, Márcia Smaniotto, Diecson da Silva, Leonardo Oliveira Santos, Leonard Piveta, Jader Job Franco, Joanei Cechin, Laís Perboni, Nixon Westendorff, Queli Ruchel, Rafael Negretti pela amizade, incentivo e momentos de convívio.

Aos bolsistas e estagiários do Centro de Herbologia (CEHERB): Bruno Moncks, Daniela Tessaro, Thiago Vieira Duarte, Lucas Thürmer, Marcelo Timm, Sandro Roberto Piesanti pela amizade, incentivo e momentos de convívio.

A minha amiga Camila Peligrinotti Tarouco pela amizade, carinho, conselhos, risadas e principalmente pelo convívio durante o período nos EUA.

A minha amiga Franciele Mattjei pela amizade, carinho e convívio durante o período em Pelotas.

Ao amigo Fernando Machado Santos pela amizade, convívio e auxílio na condução dos experimentos.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo

MARIANI, Franciele. **Caracterização de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS)**, 2014. 112f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A pressão de seleção imposta pelo uso intensivo de herbicidas inibidores da enzima ALS tem selecionado biótipos de azevém resistentes. A caracterização desses biótipos é imprescindível para estabelecer estratégias de manejo que evitem a disseminação da resistência. Dessa forma, estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o nível de resistência; identificar herbicidas alternativos para o controle dos biótipos resistentes; avaliar as características cinéticas *in vitro* da enzima ALS; avaliar a velocidade de absorção e metabolização do herbicida iodosulfurom em biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida; identificar e comparar valores adaptativos dos biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida iodosulfurom; avaliar a habilidade competitiva de biótipos de azevém resistente ou suscetível com a cultura do trigo; e, identificar o tipo de herança, número de genes envolvidos e o grau de resistência dos biótipos de azevém. Os estudos foram conduzidos com biótipos oriundos do Brasil (Col e Joi) e EUA (NC e AR). De acordo com os resultados, os biótipos Joi e Col são controlados e reduzem 50% da matéria seca com doses do herbicida entre 6-10 vezes maiores comparado com o biótipo suscetível. O biótipo Col é controlado alternativamente, em pós emergência, com os herbicidas glifosato e cletodim, e o biótipo Joi, apenas com o cletodim. Em pré-emergência, todos os herbicidas testados são alternativas para o controle dos biótipos resistentes (Joi e Col). O mecanismo de resistência dos biótipos Joi e Col não decorre do metabolismo pelas isoenzimas P450. A resistência dos biótipos NC e AR decorre da insensibilidade da enzima ao herbicida iodosulfurom, e o rápido metabolismo nos biótipos resistentes pode ser outro mecanismo de resistência. Os biótipos de azevém resistente (Joi) ou suscetível, em geral, possuem similar valor adaptativo. A cultura do trigo apresenta maior habilidade competitiva em relação aos biótipos de azevém resistente (Joi) ou suscetível. Para o biótipo de azevém resistente (Joi) a competição interespecífica é prejudicial. A resistência do biótipo de azevém Joi é codificada por gene dominante nuclear, e o biótipo heterozigoto não é controlado com a dose de registro do herbicida iodosulfurom.

Palavras-Chave: Azevém. Iodosulfurom-metilico. Resistência. Sulfonilureia.

Abstract

MARIANI, Franciele. **Characterization of biotypes *Lolium multiflorum* Lam. resistant to herbicides inhibitors of the acetolactate synthase enzyme (ALS)**, 2014. 112f. Dissertation (Doctorate) - Graduate Program in Plant Protection. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The selection pressure imposed by the intensive use of ALS enzyme inhibitors herbicides have selected resistant ryegrass biotypes. The characterization of resistant biotypes is indispensable to establish management strategies to prevent the spread of resistance. Thus, were conducted studies in order to evaluate the level of resistance; identify alternative herbicides to control biotypes resistant; evaluate the kinetic characteristics in vitro of the ALS enzyme; evaluate the absorption rate and metabolism of the iodosulfuron herbicide in ryegrass biotypes resistant and susceptible to iodosulfuron herbicide; identify and compare adaptive value of the resistant and susceptible ryegrass biotypes to iodosulfuron herbicide; evaluate the competitive ability between resistant or susceptible ryegrass biotypes with the wheat; and, indentify the inheritance type, the genes number involved with the resistance and the resistance degree from ryegrass biotypes. Were conducted studies with biotypes from Brazil (Col and Joi) and the USA (NC and AR). As results, a rate between 6-10 times higher herbicide is required to control and reduce 50% dry matter in resistant biotypes (Joi and Col) compared with susceptible. Alternatively in post emergence Col biotype is controlled with herbicides glyphosate and clethodim and Joi biotype with clethodim herbicide. The mechanism of resistance of the Joi and Col biotypes does not result from metabolism by P450 isoenzymes. The resistance of NC and AR biotypes follows from the insensitivity of the enzyme to iodosulfuron herbicide and the rapid metabolism in resistant biotypes may be another mechanism of resistance. In assessing the adaptive value between biotypes resistant ryegrass (Joi) and susceptible, in general, this is similar. The biotypes resistant ryegrass (Joi) or susceptible, in general, have similar adaptive value. The wheat crop has greater competitive ability in relation to ryegrass biotypes resistant (Joi) or susceptible. For the ryegrass biotype resistant (Joi) the interspecific competition is harmful. The resistance to ryegrass biotype Joi is encoded by nuclear dominant gene, and heterozygote biotype is not controlled with the registration rate of the iodosulfuron herbicide.

Key words: Ryegrass. Iodosulfuron-methyl. Resistance. Sulphonylurea.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 14 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 30% de controle na planta, com 95% de significância.31
- Figura 2 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 21 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.32
- Figura 3 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.33
- Figura 4 - MMSPA (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.34

Figura 5 - Variação na absorbância em diferentes concentrações de acetoína. Texas A&M University, U.S., 2012.	44
Figura 6 - Atividade da enzima ALS para diferentes proporções de planta em relação ao volume do tampão de extração. Texas A&M University, U.S., 2012. As barras indicam o erro padrão da média (Tukey 0,05).....	48
Figura 7 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoína em função do tempo de incubação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.	49
Figura 8 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoína em função da temperatura de incubação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.....	50
Figura 9 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoína em função da concentração de fosfato no tampão de reação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.....	51
Figura 10 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoína em função da variação do pH do tampão de reação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.	52
Figura 11 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio expressa em produção de acetoína em função de diferentes concentrações de substrato (piruvato) e inverso dos valores da atividade e concentração, representando o duplo recíproco. Texas A&M University, U.S., 2012..	53
Figura 12 - Inibição <i>in vitro</i> da atividade da enzima ALS em biótipo suscetível e dois resistentes pelo herbicida iodosulfurom-metilico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.	55
Figura 13 - Atividade da enzima ALS na presença de diferentes concentrações do aminoácido isoleucina em relação ao controle, sem a presença o aminoácido, em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.	56

- Figura 14 - Atividade da enzima ALS na presença de diferentes concentrações do aminoácido leucina em relação ao controle, sem a presença o aminoácido, em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.57
- Figura 15 - Atividade da enzima ALS na presença de diferentes concentrações do aminoácido valina em relação ao controle, sem a presença o aminoácido, em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.58
- Figura 16 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após o tratamento. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e a barra horizontal representa o intervalo de confiança para a dose que causa 50% de controle do biótipo suscetível, com 95% de significância..67
- Figura 17 - Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (%) de biótipos de azevém, resistente (NC e AR) e suscetível (Susc.), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após o tratamento. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e a barra horizontal representa o intervalo de confiança para a dose que causa 50% de controle do biótipo suscetível, com 95% de significância68
- Figura 18 - Velocidade de absorção do herbicida iodosulfurom-metílico sódio em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida, em horas após a aplicação. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as quatro repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.69
- Figura 19 - Metabolização de iodosulfurom-metil sódio em biótipos de azevém resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc) ao herbicida, entre 1 e 20 dias após a aplicação do mesmo. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as quatro repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.71

- Figura 20 - Recuperação de iodosulfurom-metil sódio na água de lavagem das folhas em dias após a aplicação do herbicida. Os dados foram transformados em porcentagem considerando 100% o que atingiu a planta no tempo zero. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as quatro repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.72
- Figura 21 - Estatura (EST) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.80
- Figura 22 - Área foliar (AF) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.81
- Figura 23 - Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.82
- Figura 24 - Taxa de crescimento absoluto (TCA) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.83
- Figura 25 - Taxa de crescimento foliar relativo (TCFR) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.84
- Figura 26 - Razão de área foliar (RAF) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.85
- Figura 27 - Taxa assimilatória líquida (TAL) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.86

Figura 28 - Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém, resistente ao iodosulfurom-metílico sódio, e trigo, FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Círculos vazios (○) representam a PR do biótipo resistente, círculos cheios (●) a PR do trigo e triângulos (▼) indicam a PRT. Linhas tracejadas referem-se às produtividades relativas hipotéticas, quando não ocorre interferência de uma espécie sobre a outra.88

Figura 29 - Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém suscetível ao iodosulfurom-metílico sódio e trigo, FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Círculos vazios (○) representam a PR do biótipo suscetível, círculos cheios (●) a PR do trigo e triângulos (▼) indicam a PRT. Linhas tracejadas referem-se às produtividades relativas hipotéticas, quando não ocorre interferência de uma espécie sobre a outra.89

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas utilizados nos tratamentos em pós-emergência do azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.....29
- Tabela 2 - Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas utilizados nos tratamentos utilizados em pré-emergência do azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.29
- Tabela 3 - Valores de C_{50} com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém, resistente (Col e Joi) e suscetível (Susc), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 14, 21 e 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.32
- Tabela 4 - Valores de MS_{50} com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém, resistente (Col e Joi) e suscetível (Susc), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.34
- Tabela 5 - Controle (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 14 e 21 dias após o tratamento (DAT) em pós-emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.36
- Tabela 6 - Controle (%) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 28 dias após o tratamento (DAT) em pós-emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.....37
- Tabela 7 - Número de plantas emergidas de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 10 dias após a semeadura. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011.38

Tabela 8 - Controle (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 10 e 17 dias após o tratamento (DAT), em pré-emergência. FAEM/UFPeL, Capão do Leão/RS, 2011.	39
Tabela 9 - K_m (concentração de piruvato que fornece a velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação) e $V_{máx}$ (velocidade máxima da reação) de biótipos de azevém resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2012.	53
Tabela 10 - Equação sigmoideal logística, coeficiente de determinação (R^2), dose de iodosulfurom que inibe 50% da atividade da enzima ALS (I_{50}) e razão entre os biótipos resistente e suscetível (R/S), em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao iodosulfurom-metílico sódio, submetidos a diferentes doses do mesmo <i>in vitro</i> . Texas A&M University, U.S., 2013.	55
Tabela 11 - Diferenças relativas de produtividade para as variáveis área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e produtividade relativa total (PRT), nas proporções de plantas 75:25, 50:50 e 25:75 de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao iodosulfurom-metílico sódio, competindo com trigo cultivar FUNDACEP Horizonte. UFPeL, Capão do Leão-RS, 2011	90
Tabela 12 - Resposta de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, competindo com trigo cultivar FUNDACEP Horizonte. UFPeL, Capão do Leão-RS, 2011.....	91
Tabela 13 - Índices de competitividade entre o trigo e o azevém suscetível e trigo e azevém resistente, expressos por competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamentos relativos (K) e de competitividade (C) aos 60 DAE (dias após a emergência). FAEM/UFPeL, Capão do Leão, 2011.	92
Tabela 14 - Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de azevém suscetíveis e resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2013.	98
Tabela 15 - Avaliação do controle e MMSPA, em porcentagem, em função da aplicação de doses crescentes do herbicida iodosulfurom-metílico sódio em biótipos de azevém suscetível, heterozigoto (F1) e resistente, em casa-de-vegetação, Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2013.	99

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	Capítulo I - Resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom- metílico sódio e alternativas de controle	24
2.1	Introdução	24
2.2	Material e Métodos.....	26
2.2.1	Curva de dose resposta	27
2.2.2	Metabolismo	28
2.2.3	Controle alternativo em pós e pré-emergência	28
2.3	Resultados e Discussão.....	30
2.3.1	Curva de dose resposta	30
2.3.2	Metabolismo	35
2.3.3	Controle alternativo em pós-emergência.....	35
2.3.4	Controle alternativo em pré-emergência	37
2.4	Conclusões.....	39
3	Capítulo II - Propriedades enzimáticas e mecanismo de resistência de azevém ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio	40
3.1	Introdução	40
3.2	Material e Métodos.....	42
3.2.1	Material vegetal	42
3.2.2	Extração da enzima	42
3.2.3	Bioensaio “ <i>in vitro</i> ” com a enzima ALS.....	43
3.2.4	Experimento I. Determinações de K_m e V_{max}	45
3.2.5	Experimento II. Ensaio <i>in vitro</i> da enzima ALS na presença de herbicida	46
3.2.6	Experimento III. Ensaio <i>in vitro</i> da enzima ALS na presença de aminoácidos	47

3.3 Resultados e Discussão.....	47
3.3.1 K_m e V_{max}	52
3.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> da enzima ALS na presença de herbicida.....	54
3.3.3 Ensaio <i>in vitro</i> da enzima ALS na presença de aminoácidos.....	55
3.4 Conclusões.....	59
4 Capítulo III - Velocidade de absorção e metabolização do herbicida iodosulfurom-metílico sódio em biótipos de azevém resistente e suscetível.	60
4.1 Introdução	60
4.2 Material e Métodos.....	62
4.2.1 Preparação dos padrões e fortificação de amostras.....	63
4.2.2 Estabelecimento e condução dos experimentos.....	64
4.2.3 Coleta das amostras.....	64
4.2.4 Extração acelerada por solvente (ASE)	65
4.2.5 Análise UPLC-MS.....	65
4.3 Resultados e Discussão.....	66
4.4 Conclusão.....	73
5 Capítulo IV – Valor adaptativo de biótipos de azevém resistente e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio e habilidade competitiva com a cultura do trigo	74
5.1 Introdução	74
5.2 Material e Métodos.....	76
5.3 Resultados e Discussão.....	79
5.4 Conclusões.....	93
6 Capítulo V - Herança da resistência de azevém ao iodosulfurom-metílico sódio	94
6.1 Introdução	94
6.2 Material e Métodos.....	96
6.3 Resultados e Discussão.....	97
6.4 Conclusão.....	100
7 CONCLUSÕES.....	101
8 REFERÊNCIAS.....	103
Vita.....	112

1 INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é planta anual, herbácea, de fecundação cruzada e amplamente utilizada como planta forrageira. Em contrapartida, é considerada planta daninha em culturas anuais e perenes na região Sul do Brasil (ROMAN et al., 2004). Na cultura do trigo, o azevém compete intensamente pelos recursos do meio, principalmente devido às semelhanças entre as duas espécies (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 1997) e em culturas de verão, na pré-semeadura, interferindo no estabelecimento dessas culturas.

O potencial de perda de produtividade das culturas devido a presença de plantas daninhas são mais elevadas (34%), do que qualquer outra praga (OERKE, 2006). O controle de plantas daninhas em sistemas agrícolas, em todo o mundo, têm sido dominado pelo uso de herbicidas (BUSI et al., 2011). Essa forte e persistente pressão de seleção tem contribuído para a evolução global de espécies resistentes a herbicidas (POWLES; YU, 2010). A resistência é caracterizada como a habilidade adquirida da planta daninha em sobreviver e se reproduzir após submetida a dose herbicida a qual normalmente tem controle efetivo sobre a população (VARGAS et al., 2009).

Atualmente, já foram relatados 429 casos em 234 espécies de plantas daninhas resistentes aos diferentes mecanismos de ação herbicida, em 80 culturas e em 25 diferentes países do mundo. Dentre os mecanismos de ação, os inibidores da acetolactato sintase (ALS) possuem o maior número de relatos de espécies resistentes, 144, incluindo três espécies de *Lolium* (HEAP, 2014). O primeiro caso de azevém resistente aos herbicidas inibidores de ALS foi registrado na Itália em 1995, a partir de então, foram relatados casos nos Estados Unidos, Chile, Brasil, Dinamarca e Argentina (HEAP, 2014). No Brasil, os casos foram confirmados no ano

de 2010 no Estado do Rio Grande do Sul e existem casos relatados no Paraná e Santa Catarina.

Os inibidores da ALS agem inibindo a enzima acetolactato sintase, também conhecida como acetohidroxiácido sintase (AHAS), interrompendo a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (VARGAS et al., 2009). A ALS catalisa a descarboxilação da molécula de piruvato e sua condensação com outra molécula de piruvato ou α -cetobutirato. A primeira reação produz acetolactato, precursor da valina e da leucina, e a segunda reação produz acetohidroxibutirato, precursor da isoleucina (CHIPMAN; BARAK; SCHLOSS, 1998). Os grupos químicos que pertencem a esse mecanismo de ação são as sulfonilureias, imidazolinonas, pirimidiloxibenzoatos, sulfonamidas e triazolopirimidinas (SENSEMAN, 2007). A molécula iodosulfurom-metílico sódio pertence ao grupo das sulfonilureias e é o principal herbicida para o controle do azevém, em pós emergência, na cultura do trigo.

A frequência de ocorrência de populações resistentes aos inibidores da enzima ALS pode ser atribuída à utilização generalizada desses herbicidas, com o maior número de moléculas registradas, num total de 56 (HEAP, 2014) e os mais utilizados no mundo (TRANEL; WRIGHT, 2002). Em outros casos, a evolução da resistência é atribuída à falta de rotação ou mistura de herbicidas (BECKIE; REBOUD, 2009). Outros fatores como alta eficiência para biótipos sensíveis e atividade residual no solo contribuem para o aumento de casos de resistência (TRANEL; WRIGHT, 2002). Em populações de *L. rigidum* a alta frequência inicial de indivíduos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS ($2,2 \times 10^{-5}$ à $1,2 \times 10^{-4}$), que nunca antes foram expostos a esses herbicidas, também ajuda a explicar a rápida evolução da resistência (PRESTON; POWLES, 2002).

Um grande problema para azevém, é que muitas populações da espécie, em todo o mundo, estão evoluindo com resistência aos poucos herbicidas pós emergentes que existem no mercado para o controle da espécie (KAUNDUN et al., 2013). Em 75 populações de azevém coletadas no leste de Washington e norte de Idaho, 25% são resistentes a três grupos químicos dos inibidores da ALS e 27% possuem resistência múltipla, tanto aos inibidores de ALS como aos inibidores da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCCase) (RAUCH et al., 2010). A resistência múltipla caracteriza-se por uma planta possuir dois ou mais mecanismos distintos de resistência a herbicidas de diferentes grupos químicos, sendo que a resistência

cruzada ocorre quando biótipo é resistente a dois ou mais herbicidas, devido a apenas um mecanismo (AGOSTINETTO; VARGAS, 2009).

O desenvolvimento da resistência das plantas daninhas aos herbicidas é influenciado por vários fatores. Podem estar ligados à genética (frequência de genes resistentes, números de genes envolvidos com a resistência, se o gene de resistência é dominante e se ocorre custo de adaptação dos genes de resistência), à biologia das plantas daninhas (se possuem polinização cruzada ou autopolinização, capacidade de produção de sementes, longevidade do banco de sementes no solo e capacidade de dispersão do pólen), ao herbicida (estrutura química, local de ação e tempo de atividade residual) e práticas operacionais (dose do herbicida, habilidade do operador e manejo adotado como, por exemplo, práticas alternativas ao controle químico das plantas daninhas e rotação de culturas) (POWLES; YU, 2010).

A evolução da resistência em população de plantas daninhas pode ser resultado da absorção ou translocação diferencial, metabolismo diferencial, alteração na enzima-alvo, compartimentalização ou sequestro e por possuir maior capacidade de exsudação do composto para o ambiente (HALL et al., 1998).

Quando a resistência está associada à alteração no local de ação do herbicida este pode representar mudança na funcionalidade da enzima, resultando em insuficiente ou excessivo produto da biossíntese (VILA-AIUB et al., 2009). A alteração na enzima ALS, sítio de ação dos herbicidas, pode resultar em mudança de afinidade tanto com o herbicida quanto pelos substratos nas rotas que a ALS está envolvida. A ocorrência de mudanças na ecologia e fisiologia das plantas ocorrem em poucos tipos de mutação e normalmente são as mutações que ocorrem com menor probabilidade (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013). Isso explica, porque a evolução nos casos de resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS é a mais pronunciada, ou seja, a alteração mantém a funcionalidade normal da planta, sem refletir em custo adaptativo (VILA-AIUB, 2010).

A maior parte dos casos reportados de resistência aos inibidores da enzima ALS envolvem um único ponto de mutação no gene alvo que reduz a afinidade da enzima ao herbicida (BURGOS et al., 2013). Porém, a maioria dos estudos focam apenas em elucidar o mecanismo relacionado ao local alvo e não examinam a resistência relacionada ao local não alvo de ação do herbicida (AHMAD-HAMDANI et al., 2013; BURGOS et al., 2013). Em alguns casos, ambos os mecanismos podem estar envolvidos, como no caso de *Avena spp.* aos inibidores da ACCase (AHMAD-

HAMDANI et al., 2013). Portanto, é necessário examinar tanto o local alvo, como não alvo, de ação dos herbicidas considerando a possibilidade de coexistência (AHMAD-HAMDANI et al., 2013). Quando o mecanismo de resistência não é relacionado à alteração do local de ação, uma ou mais formas atuam impedindo que o herbicida chegue em quantidades letais no ponto de inibição, impedindo sua inibição completa (POWLES; YU, 2010). Estes mecanismos envolvem a diminuição da absorção e/ou da translocação dos herbicidas, aumento das taxas de metabolismo ou sequestro do herbicida (FENG et al., 2004; DINELLI et al., 2008; POWLES; YU, 2010).

As plantas daninhas que evoluíram com um ou mais mecanismos de resistência, podem apresentar algum tipo de efeito pleitrópico. A comparação do valor adaptativo ou adaptabilidade ecológica e habilidade competitiva do biótipo resistente em relação ao suscetível são fatores que podem influenciar de forma significativa na taxa de evolução da resistência e/ou frequência inicial, ou mesmo na manutenção da proporção de plantas resistentes dentro da população quando da ausência da pressão de seleção do herbicida (JASIENIUK; BRÛLÉ-BABEL; MORRISON, 1996). Biótipos mais adaptados são normalmente mais competitivos e capazes de aumentar sua proporção ao longo do tempo, eliminando, assim, os indivíduos menos aptos a ocupar determinado nicho ecológico (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE, 1997).

Em algumas espécies de plantas a resistência aos inibidores da enzima ALS dissemina-se facilmente na população, tornando-se uma ameaça para o uso continuado dos herbicidas. Isso ocorre, quando mutações na enzima ALS que conferem resistência possuem genes parcialmente dominantes e nuclear, sendo transmitida pela semente ou pólen (TRANEL; WRIGHT, 2002). Os estudos de herança fornecem importantes subsídios para compreender a evolução de resistência a herbicidas, estrutura genética de populações de plantas daninhas, dinâmica da adaptação e como manejar a resistência (NEVE; VILA-AIUB; ROUX, 2009). Em *Euphorbia heterophylla*, por exemplo, a resistência a inibidores da enzima ALS é codificada por gene dominante nuclear, com rápida disseminação na população (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001). Em uma população de *L. rigidum*, com resistência ao paraquat, a resistência é transmitida por um gene nuclear, dominante ou semi-dominante (YU et al., 2009). Em semelhança a populações de azevém, resistentes ao glifosato, em que a resistência é codificada por gene semi-dominante

e nuclear, em que o biótipo heterozigoto possui sensibilidade intermediária ao glifosato (VARGAS; MORAES; BERTO, 2007).

O diagnóstico de população de plantas daninhas resistentes e sua caracterização é imprescindível para propor estratégias de manejo que evitam a disseminação da resistência. O controle químico é uma ferramenta importante de manejo e tem proporcionado o cultivo de áreas agrícolas em grande escala de forma econômica.

Diante disso, o trabalho teve como hipóteses gerais que biótipos de azevém apresentam resistência ao herbicida iodosulfurom, pertencente ao mecanismo de ação inibidor da enzima ALS; biótipos resistentes de azevém são controlados por herbicidas pertencentes a diferente mecanismo de ação recomendados para a espécie; o mecanismo responsável pela resistência ao herbicida iodosulfurom decorre da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida; a velocidade de absorção e metabolização do iodosulfurom em biótipos de azevém é mais rápida em biótipos resistentes ao herbicida; biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida iodosulfurom não diferem quanto ao valor adaptativo quando crescem na ausência do agente de seleção (herbicida); o trigo apresenta habilidade competitiva superior aos biótipos de azevém resistente e suscetível ao herbicida iodosulfurom; e, biótipos de azevém resistentes ao herbicida inibidor da enzima ALS apresentam herança da resistência monogênica e nuclear.

Dessa forma, os objetivos do trabalho foram: avaliar o nível de resistência em biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom; identificar os herbicidas alternativos para o controle da espécie; caracterizar o local de ação dos herbicidas inibidores da ALS de azevém comparando bioquimicamente plantas resistentes e suscetíveis ao herbicida iodosulfurom; avaliar a velocidade de absorção e metabolização do herbicida iodosulfurom em biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida; identificar e comparar valores adaptativos dos biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida iodosulfurom; avaliar a habilidade competitiva dos biótipos de azevém resistente ou suscetível com trigo; e, identificar o tipo de herança, número de genes envolvidos e o grau de resistência dos biótipos, de azevém, homozigotos e heterozigotos resistentes ao herbicida iodosulfurom.

2 CAPÍTULO I - Resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio e alternativas de controle

2.1 Introdução

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma gramínea anual amplamente utilizada como forrageira em regiões temperadas e considerada importante planta daninha competidora nas lavouras de trigo no Brasil e em vários países. Na cultura do trigo o azevém compete intensamente pelos recursos do meio, principalmente devido às semelhanças entre as duas espécies (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 1997). O controle químico do azevém é realizado basicamente com o herbicida iodosulfurom-metílico, seletivo a cultura do trigo. A carência de herbicidas alternativos para o controle de azevém no trigo aumentou a pressão de seleção e propiciou o aumento dos casos de populações resistentes ao iodosulfurom-metílico. A resistência é habilidade adquirida de planta daninha em sobreviver e se reproduzir após submetida a dose herbicida a qual normalmente tem controle efetivo sobre a população (VARGAS et al., 2009).

O iodosulfurom-metílico pertence ao mecanismo de ação inibidor da enzima acetolactato sintase (ALS), grupo químico das sulfonilureias. Esse grupo de herbicidas age inibindo a enzima ALS, interrompendo a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (VARGAS et al., 2009).

Biótipos da espécie azevém foram identificados pela primeira vez como resistentes em 1987, no Estado do Oregon, nos USA, ao herbicida diclofop metílico cujo mecanismo de ação é a inibição da ACCase. No Brasil, o primeiro caso de resistência foi registrado em 2003, ao herbicida glifosato, inibidor da EPSPs. Aos inibidores da ALS os primeiros casos foram registrados em 1995 em Arkansas e Mississippi nos USA, e mais tarde foram registrados casos de resistência no Chile

(2002) e Idaho (2003), também nos USA. No Rio Grande do Sul já foram identificados biótipos de azevém resistente ao glifosato e mais recentemente a inibidores de ACCase e ALS (HEAP, 2014).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um problema de caráter nacional e mundial, de rápida evolução, causando preocupação para agricultura. Uma vez detectada a resistência deve-se adotar alternativas de manejo para diminuir a pressão de seleção. Uma maneira de caracterizar quantitativamente o nível de resistência é através de curvas dose-resposta. Através destas, é possível identificar a dose do herbicida que promove 50% de controle (C_{50}) ou redução da matéria seca (MS_{50}) de ambos os biótipos (CHRISTOFFOLETI, 2002). O fator de resistência (FR), que corresponde à razão entre o C_{50} ou MS_{50} do biótipo resistente pelo correspondente do biótipo suscetível, expressa o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% do biótipo resistente é superior à dose que controla 50% do biótipo suscetível (HALL et al., 1998).

A identificação do mecanismo que envolve a resistência é fundamental para estabelecer medidas de controle e evitar a evolução da população resistente. Entre os principais mecanismos responsáveis pela resistência aos inibidores da ALS está a metabolização e alteração no local alvo de ação do herbicida (TRANEL; WHIRGH, 2002; YU et al., 2009; KAUNDUN; DALE; BAILLY, 2012). Quando a resistência envolve a metabolização, as isoenzimas P450 são as principais responsáveis pela rápida degradação do herbicida. Em biótipos de *L. rigidum* a combinação de malation e uma sulfonilureia aumentaram a mortalidade das plantas resistentes ao herbicida (CHRISTOPHER; PRESTON; POWLES, 1994). A utilização de inibidores da P450 pode ser uma forma de avaliar a metabolização, pois inseticidas organofosforados, como o malation, inibem a enzima e reverterem a resistência (YU et al., 2009).

Uma vez caracterizado o nível e mecanismo de resistência dos biótipos são importantes medidas de controle entre elas, a utilização de herbicidas que apresentam mecanismos distintos aos inibidores da enzima ALS. O azevém é um caso preocupante em diversas partes do mundo quanto à evolução da resistência a herbicidas, devendo ser rotacionado o mecanismo de ação para evitar o aparecimento de novos casos de resistência. De acordo com Powles e Holtum (1994), quando uma população apresenta resistência a apenas uma classe de herbicida, o sucesso no manejo da resistência pode ser alcançado através de herbicidas alternativos. Desse modo, foram selecionados herbicidas com ação em

pós e pré-emergência, com distintos mecanismos de ação, com potencial para controlar o azevém resistente e servir de opção de manejo, contribuindo para evitar a pressão de seleção.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o nível de resistência em biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom-metílico, o metabolismo baseado na inibição das isoenzimas P450 e a identificação dos herbicidas alternativos para o controle da espécie.

2.2 Material e Métodos

Inicialmente foram realizadas coletas de plantas de azevém suspeitas de resistência em cidades do Rio Grande do Sul, com o objetivo de confirmar a resistência. No total, foram coletados 307 biótipos. As sementes coletadas foram semeadas em caixas e quando apresentavam de 2-3 folhas foi realizada a aplicação iodosulfurom-metílico na dose de 5 g i.a ha⁻¹. Após 30 dias da aplicação do tratamento, as plantas foram avaliadas quanto à fitotoxicidade, adotando-se a escala percentual, onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte de plantas, respectivamente. Foram identificados 102 biótipos resistentes, destes, optou-se por trabalhar com dois biótipos, os quais apresentavam menores sintomas de fitotoxicidade, ou seja, maior grau de resistência. Essa etapa de coleta e identificação dos biótipos fez parte de um trabalho de dissertação (SILVA, 2012). A partir desse trabalho, foram produzidas sementes dos biótipos escolhidos, oriundos das cidades de Jóia (Joi) e Colorado (Col), localizados a uma latitude de 28° 38' 51" e longitude de 54° 07' 21" para o Joi, e, latitude de 28° 28' 55" e longitude de 53° 01' 13" para o Col. O biótipo suscetível (Susc) foi coletado em área sem histórico de aplicação de herbicida (latitude 31° 48' 04" e longitude 52° 24' 50"), localizado na cidade de Pelotas.

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e na Embrapa Trigo/Passo Fundo. Foram realizados cinco experimentos: estabelecimento da curva de dose resposta, avaliação do metabolismo com o inibidor malation e controle alternativo com herbicidas pré e pós-emergentes.

2.2.1 Curva de dose resposta

Para o experimento de dose resposta foram utilizados vasos com capacidade de 550 mL, preenchidos com substrato comercial Germina Plant® e arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e uma planta por unidade experimental. Para a determinação da dose que controla 50% da população (C_{50}) e reduz 50% da massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (MS_{50}), foram realizadas aplicações crescentes do herbicida iodosulfurom-metílico sódio (Hussar®) nas doses 0, 0,375, 0,75, 1,5, 3,0, 4,5, 12, 18, 24, 48, 96, 192 e 384 g i.a ha⁻¹, em estágio de 2-3 folhas, considerando 3,5 g i.a ha⁻¹ ou 70 g PC. ha⁻¹, como a dose de registro. À calda de aplicação foi adicionado o espalhante adesivo Hoefix® na dose de 0,3% v/v. A aplicação dos tratamentos foi realizada com auxílio de pulverizador costal, pressurizado a CO₂, equipado com bico do tipo leque com ponta de pulverização 110.015, calibrado para aplicar 150 L ha⁻¹ de calda herbicida.

As variáveis avaliadas foram controle visual e MMSPA. O controle foi avaliado aos 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), adotando-se a escala percentual, onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte de plantas, respectivamente. A MMSPA foi determinada após avaliação do controle pela secagem do material vegetal em estufa a temperatura de 60°C até atingir massa constante.

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Quando significativo, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear log-logístico e C_{50} e MS_{50} calculados a partir dos parâmetros da equação (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995). A análise de regressão foi realizada com auxílio do programa SigmaPlot 10.0 (SIGMAPLOT, 2007), ajustando-se os dados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico, conforme segue:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

Onde: y = porcentagem de controle; x = dose do herbicida; e a , x_0 e b = parâmetros da equação, sendo que a é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva, x_0 é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e b é a declividade da curva.

O fator de resistência (FR) foi calculado pela divisão do C_{50} ou MS_{50} do biótipo resistente pelos correspondentes ao do biótipo suscetível. O intervalo de confiança foi calculado através de estimação por intervalo para média μ com variância estimada, conforme a equação:

$$P(\bar{X} - t_{\alpha/2} \sqrt{S^2/n} \leq \mu \leq \bar{X} + t_{\alpha/2} \sqrt{S^2/n}) = 1 - \alpha$$

Onde, $\bar{X}$ corresponde ao C_{50} ou FS_{50} , $t_{\alpha/2}$ valor da tabela t de student, S^2 o quadrado médio do erro do x_0 , obtido na regressão não-linear e n o número de repetições (STORCK; LOPES; LÚCIO, 2001).

2.2.2 Metabolismo

O estudo para verificar se o mecanismo de resistência envolve a metabolização foi realizado com um inseticida organosfosforado conhecido por inibir as izoenzimas P450, o malation. O experimento foi conduzido apenas com os biótipos resistentes (Col e Joi), sendo a instalação foi semelhante ao experimento de dose resposta, com três repetições, com e sem a aplicação do malation e 5 doses do herbicida iodosulfurom (0, 3, 6, 12 e 24 g i.a ha^{-1}). O malation foi aplicado na dose de 1000 g i.a ha^{-1} , meia hora antes da aplicação do herbicida. Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Cada biótipo foi analisado separadamente. Quando significativo, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear log-logístico ou polinomial.

2.2.3 Controle alternativo em pós e pré-emergência

Para os experimentos de controle alternativo com herbicidas pré e pós-emergentes foram utilizados vasos com capacidade de 550 mL, preenchidos com solo (Latossolo Vermelho distrófico típico) e substrato comercial Germina Plant®, respectivamente. Os tratamentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os herbicidas pós-emergentes foram aplicados conforme descrito no experimento de dose resposta e para os pré-emergentes as sementes foram semeadas (5 sementes/vaso) e logo em seguida os herbicidas foram aplicados em solo pré umedecido. Os tratamentos constaram de herbicidas

pertencentes a diferentes mecanismos de ação, conforme tab. 1 para os pós-emergentes e tab. 2 para os pré-emergentes.

As variáveis avaliadas foram controle visual aos 14, 21 e 28 DAT e MMSPA aos 28 DAT para o experimento com os herbicidas aplicados em pós-emergência, seguindo os mesmos procedimentos descritos no experimento de dose resposta. Para os herbicidas aplicados em pré-emergência os tratamentos foram avaliados aos 10 DAT com a contagem do número de plantas emergidas e aos 10 e 17 DAT, o controle visual.

Tabela 1 - Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas utilizados nos tratamentos em pós-emergência do azevém. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Mecanismo de ação	Grupo químico	Ingrediente Ativo	Produto comercial	Dose g i.a. ha ⁻¹
Inib. de ALS	Sulfonilureia	Iodosulfurometílico	Hussar	3,5
Inib. de protox	Triazolinona	Carfentrazone-etílica	Aurora	45,0
Inib. da síntese de carotenóides	Isoxazolidinona	Clomazona	Gamit 360 CS	360,0
Inib. da EPSPs	Glicina substituída	Glifosato	Glifosato Nortox	960,0
Inib. de ALS	Imidazolinona	Imazetapir	Pivot	100,0
Inib. de ACCase	Ciclohexanodionas	Cletodim	Select 240 EC	96,0

Foi adicionado óleo mineral aos herbicidas Hussar (0,3% v/v), Aurora e Select (0,5% v/v).

Tabela 2 - Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas utilizados nos tratamentos utilizados em pré-emergência do azevém. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Mecanismo de ação	Grupo químico	Ingrediente Ativo	Produto comercial	Dose g i.a. ha ⁻¹
Inib. de ALS	Imidazolinona	Imazapir + Imazapique	Kifix	78,75 + 26,25
Inib. de polimerização da tubulina	Dinitroanilina	Pendimentalina	Herbadox	1.500
Inib. da síntese de carotenóides	Isoxazolidinona	Clomazona	Gamit 360 CS	648
Inib. Fotossistema II	Triazinona	Metribuzim	Sencor 480	480
Inib. Fotossistema II	Triazina	Atrazina	Proof	2.250
Inib. da síntese de ácido nucleicos e proteínas	Cloroacetamida	S-metolacoloro	Dual Gold	1.920

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Quando significativo, os biótipos e herbicidas foram comparados pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Curva de dose resposta

O teste de Shapiro-Wilk demonstrou não ser necessária a transformação dos dados. O teste F pela análise de variância demonstrou interação significativa entre os fatores dose e biótipo para todas as variáveis no experimento de dose resposta.

Aos 14 DAT os biótipos Susc e Joi não atingiram o controle de 50% (Fig. 1). O biótipo resistente Col apresentou maior fitotoxicidade comparado ao biótipo Susc. Foram calculadas as doses necessária para atingir o controle de 30%, com valores de 5 e 4,9 g i.a ha⁻¹ para os biótipos Col e Susc, respectivamente, sem diferença significativa entre eles (tab. 3). Dose maior, de 47 g i.a ha⁻¹ foi necessária para atingir o mesmo controle de 30% para o biótipo Joi, com fator de resistência de 10.

Quando avaliado o controle aos 21 DAT ambos os biótipos resistentes necessitaram uma dose maior para o controle comparado ao Susc (Fig. 2). O C₅₀ foram de 19,8, 25,2 e 2,65 g i.a ha⁻¹ para os biótipos Col, Joi e Susc, respectivamente (tab. 3). As doses para os biótipos resistentes diferiram do biótipo Susc e os fatores de resistência foram de 7,47 e 9,50 para o Col e Joi, respectivamente.

Aos 28 DAT o controle também foi superior para o biótipo Susc, com dose de 2,65 g i.a ha⁻¹ para atingir o controle de 50%, já para os resistentes as doses foram de 20 e 16,4 g i.a ha⁻¹ para o Col e Joi, respectivamente (Fig. 3). Os fatores de resistência foram de 10 e 8 para o Col e Joi, respectivamente (tab.3). Considerando que a dose de registro do herbicida iodosulfurom-metílico para controle do azevém é de 3,5 g i.a. ha⁻¹, ambos os biótipos resistentes apresentaram a dose do C₅₀ acima da recomendada. No entanto, esperava-se que essas doses fossem maiores, pois na maioria dos casos a resistência aos inibidores da enzima ALS é uma mutação na enzima (YU et al., 2012), exigindo doses altas para controle das plantas resistentes (LAMEGO et al., 2009; BECKIE et al., 2012).

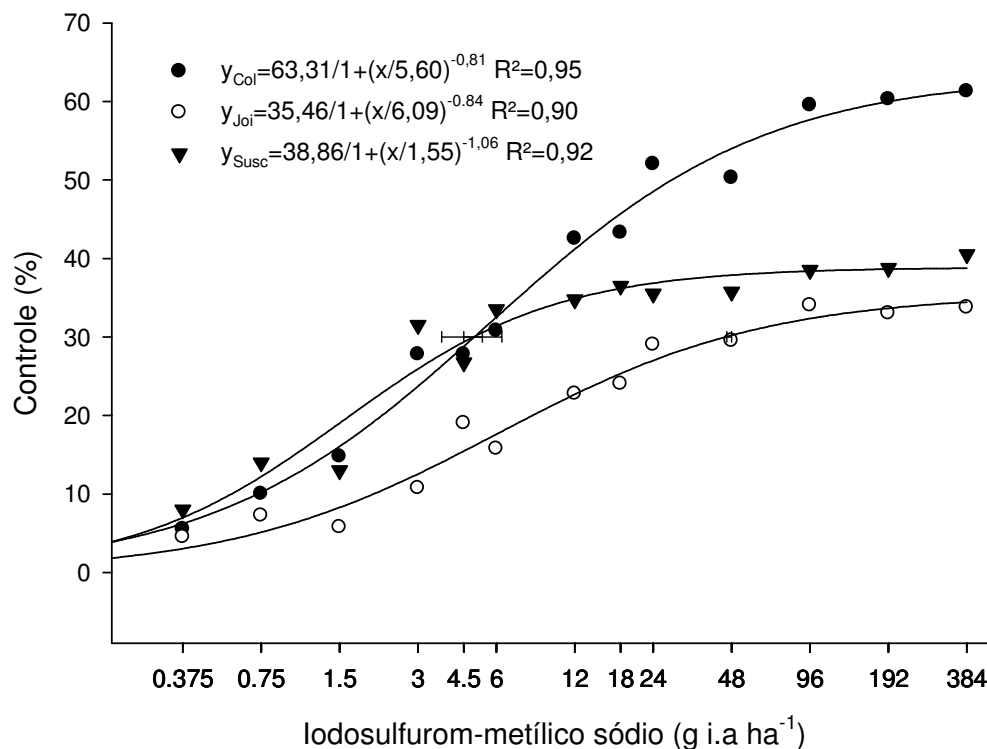


Figura 1 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 14 dias após o tratamento. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 30% de controle na planta, com 95% de significância.

A explicação para níveis diferenciais de resistência está no tipo de aminoácido alterado, quando o mecanismo envolvido é alteração na enzima, exigindo doses maiores ou menores para o controle dependendo da mutação (YU et al., 2012). É provável que diferença maior fosse encontrada em avaliações após os 28 dias, pois as plantas resistentes estavam recuperando seu crescimento. Considerando que temperaturas entre 20 e 25 °C sejam as ótimas para o crescimento da espécie (HANNAWAY; COOL, 2004). O experimento foi realizado nos meses de julho, agosto e início de setembro de 2011, a média de temperatura nesse período foi de 13,1 °C, conforme dados meteorológicos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, ou seja, abaixo das condições ótimas de desenvolvimento.

Tabela 3 - Valores de C_{50} com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém, resistente (Col e Joi) e suscetível (Susc), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 14, 21 e 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Biótipo	C ₃₀ ¹		Fator de resistência ²
	g i.a ha ⁻¹	95% IC	
14 DAT			
Col	5,00	3,70-6,30	ns
Joi	47,00	45,97-48,03	10
Susc	4,90	4,49-5,30	-
C ₅₀ ³			
21 DAT			
Col	19,80	17,81-21,79	7
Joi	25,20	23,79-26,61	10
Susc	2,65	2,30-2,99	-
28 DAT			
Col	20,00	17,42-22,58	10
Joi	16,40	14,96-17,84	8
Susc	1,93	1,56-2,29	-

^{1,3} C_{30} ; C_{50} = dose necessária para obter 30 e 50% de controle, respectivamente;

² Fator de resistência ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio dos biótipos de azevém, obtido da divisão do C_{50} do biótipo resistente em relação ao biótipo suscetível.

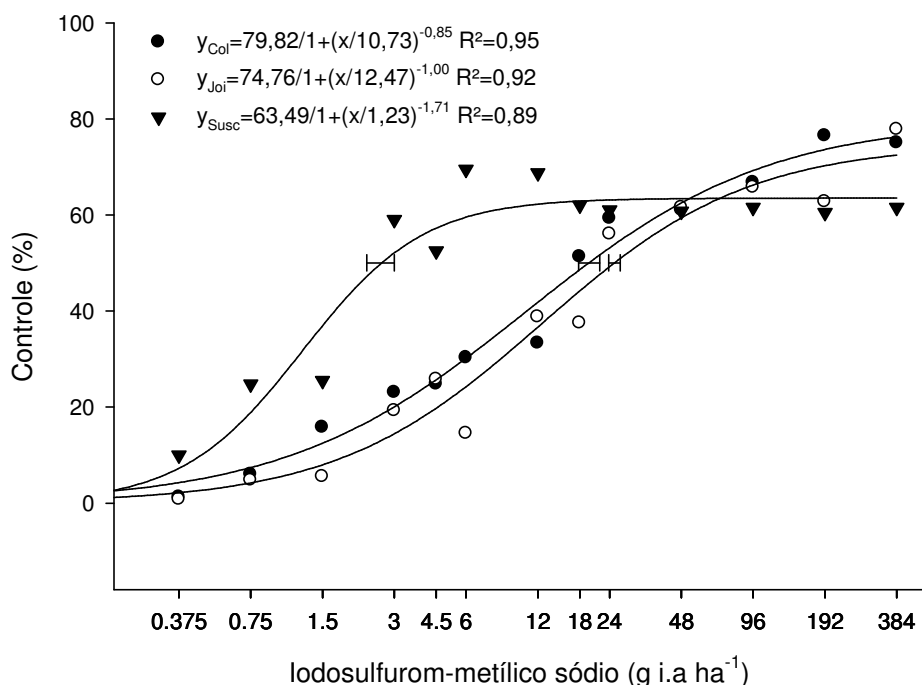


Figura 2 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 21 dias após o

tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.

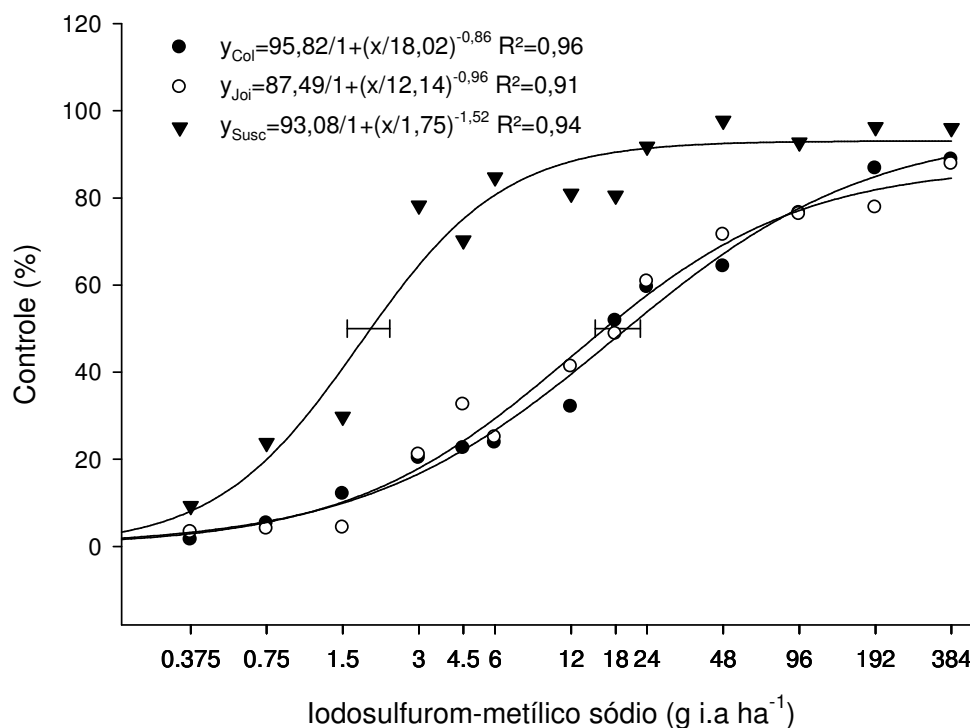


Figura 3 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.

A avaliação da MMSPA aos 28 DAT, confirmou os resultados do controle, sendo necessário doses de 4,04, 4,8 e 0,612 g i.a ha⁻¹ para redução de 50% da MMSPA nos biótipos Col, Joi e Susc, respectivamente (Fig. 4; tab. 4). Os fatores de resistência foram de 6 e 8 para os biótipos Col e Joi, respectivamente.

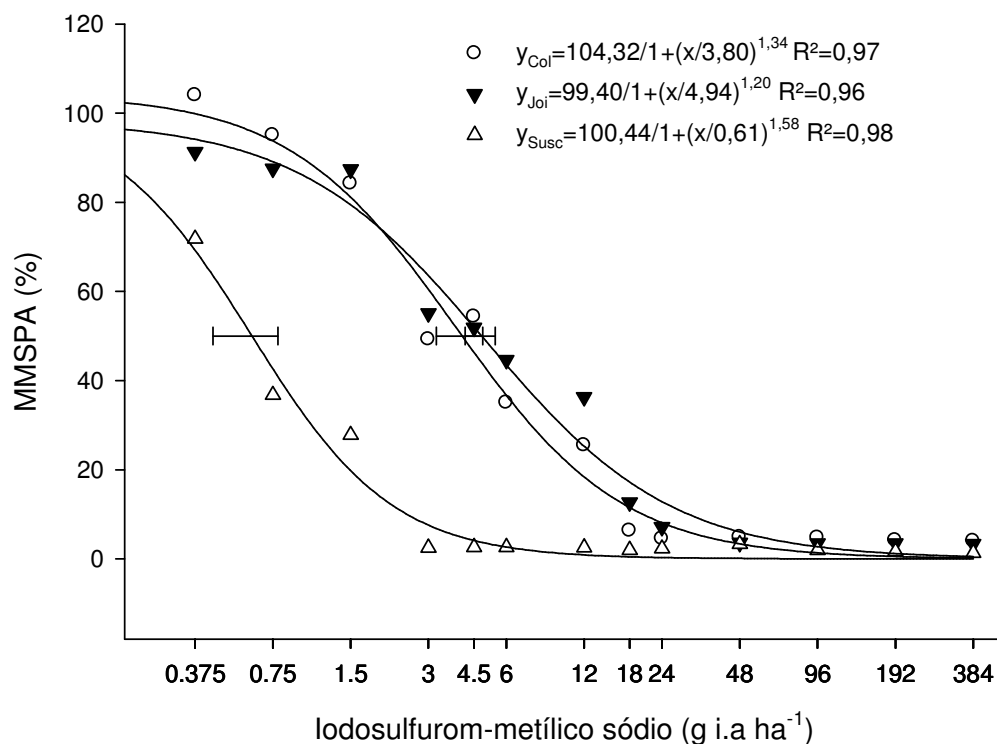


Figura 4 - MMSPA (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.

Tabela 4 - Valores de MS_{50} com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém, resistente (Col e Joi) e suscetível (Susc), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Biótipo	MS_{50} ¹		Fator de resistência ²
	g i.a ha ⁻¹	95% IC	
Col	4,04	3,22-4,85	6
Joi	4,8	4,16-5,43	8
Susc	0,612	0,44-0,78	-

¹ MS_{50} = dose necessária para obter 50% de redução da massa seca;

² Fator de resistência ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio dos biótipos de azevém, obtido da divisão do MS_{50} do biótipo resistente em relação ao biótipo suscetível.

2.3.2 Metabolismo

Houve interação para os fatores doses de iodosulfurom e malation para ambos os biótipos (Joi e Col) (dados não apresentados). Para a variável controle e MMSPA na presença de malation, para o biótipo Col, os dados não se ajustaram ao modelo de regressão. O controle diferiu com o uso do malation apenas na dose 12 g i.a ha⁻¹ do herbicida, com controle superior quando utilizado o malation, no entanto, nessa mesma dose, a MMSPA não diferiu entre os tratamentos. Houve diferença quanto a MMSPA do biótipo Col apenas na dose 6 g i.a ha⁻¹ do herbicida, com maior redução sem utilizar o malation. Para o biótipo Joi, o controle foi superior quando associado ao malation na dose 6 g i.a ha⁻¹ do herbicida porém, em relação a MMSPA, nessa mesma dose, houve menor redução. Pode-se concluir para ambos os biótipos que o mecanismo de resistência associado a metabolização, mediada pelo grupo das isoenzimas P450, é pouco provável ser o responsável pela resistência. Uma maior inibição da enzima com o uso do inseticida malation era esperado se a hipótese fosse confirmada.

Plantas de capim-arroz resistentes ao imazetapir são melhor controladas quando utilizado o malation (MATZENBACHER et al., 2011). Em *L. rigidum* a resistência aos inibidores da ALS é revertida utilizando o malation, com uma diminuição de 8 vezes a dose do herbicida necessária para controlar 50% da população (YU et al., 2009), comprovando que o mecanismo de resistência associado envolve o aumento do metabolismo mediado pelas isoenzimas P450.

2.3.3 Controle alternativo em pós-emergência

O teste F pela análise de variância demonstrou interação significativa entre os fatores biótipo e herbicida para todas as variáveis avaliadas. De acordo com os resultados, aos 14 e 21 DAT o controle do biótipo Susc não diferiu do resistente Col, sendo que os menores sintomas de fitotoxicidade foram observados para o biótipo Joi (tab. 5). Aos 14 DAT os biótipos Col e Joi apresentaram menor controle com o herbicida imazetapir e o biótipo Susc ao imazetapir e carfentrazone. Aos 21 DAT os herbicidas carfentrazone e imazetapir proporcionaram o menor controle, entre os herbicidas avaliados, para ambos os biótipos resistentes e Susc. Entre os biótipos, o Susc apresentou menor controle com o imazetapir comparado aos biótipos

resistentes. Isso indica uma provável resistência cruzada dos biótipos para as sulfonilureias e imidazolinonas.

Tabela 5 - Controle (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 14 e 21 dias após o tratamento (DAT) em pós-emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Tratamento	14 DAT			21 DAT		
	Col	Joi	Susc	Col	Joi	Susc
Testemunha	^{ns} 0 d	0 d	0 d	^{ns} 0 d	0 d	0 e
Iodosulfurom	AB 49 ab	B 36 b	A 52 ab	AB 52 b	B 43 bc	A 68 b
Carfentrazone	^{ns} 35 b	31 b	36 c	^{ns} 28 c	33 c	41 d
Clomazona	B 49 ab	A 64 a	B 52 ab	C 47 b	A 65 a	B 55 c
Glifosato	AB 51 a	B 41 b	A 63 a	A 76 a	B 55 ab	A 87 a
Imazetapir	B 18 c	C 13 c	A 41 bc	B 20 c	B 25 c	A 50 cd
Cletodim	A 58 a	A 60 a	B 52 ab	A 87 a	C 66 a	B 79 ab
CV (%)	19	14	15	17	23	10

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e antecedida de mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

ns = não significativo ($p \geq 0,05$).

Considerando o controle aos 28 DAT, para o herbicida iodosulfurom, o biótipo Susc apresentou um controle 40 e 60% superior comparado com os biótipos Joi e Col, respectivamente (tab. 6). O herbicida imazetapir, cujo mecanismo de ação ocorre por inibição da enzima ALS, controlou eficientemente o biótipo Susc e apresentou controle insatisfatório dos biótipos resistentes, confirmado também na avaliação da MMSPA. O herbicida que proporcionou melhor controle para ambos os biótipos foi o cletodim além do glifosato para o biótipo Col. Quando avaliada a MMSPA os resultados indicam eficiência como alternativa de controle aos biótipos resistentes os herbicidas glifosato, cletodim e clomazona. Para o herbicida clomazona, quando considerado o controle aos 28 DAT, os percentuais ficaram abaixo de 50%, não consistindo em opção para o controle de azevém resistente. Resultado semelhante foi observado para o herbicida glifosato considerando o biótipo Joi, com controle de 52%, nesse caso, a menor sensibilidade ao herbicida faz com que este não seja uma boa opção de controle. Considerando que existem populações de azevém resistentes ao herbicida glifosato no Rio Grande do Sul (HEAP, 2014) esse biótipo pode ter certo nível de resistência ao glifosato.

Os herbicidas glifosato e cletodim apresentaram níveis de controle próximos de 90% e reduziram a MMSPA dos biótipos Col e Susc, sendo eficientes como

alternativas de controle. Para o biótipo Joi apenas o cletodim foi o mais eficiente como alternativa. Dessa forma, o cletodim pode ser indicado para manejo de azevém resistente aos inibidores de ALS e o herbicida glifosato pode ser utilizado em população conhecida por ser suscetível ao mesmo. Considerando que já há registro da resistência de azevém para glifosato e cletodim no Brasil (HEAP, 2014) recomenda-se monitoramento constante da população e adoção de medidas adicionais de manejo, como rotação do uso de herbicida com diferente mecanismo de ação, eliminação de plantas suspeitas de resistência, entre outras, para evitar acúmulo de diferentes mecanismos de resistência em um mesmo biótipo.

Tabela 6 - Controle (%) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 28 dias após o tratamento (DAT) em pós-emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Tratamento	28 DAT			MMSPA		
	Col	Joi	Susc	Col	Joi	Susc
Testemunha	^{ns} 0 d	0 d	0 e	^{ns} 100 a	100 a	100 a
Iodosulfurom	B 43 b	B 28 c	A 73 bc	A 46 bc	A 52 bc	B 6 c
Carfentrazone	B 9 cd	B 17 cd	A 38 d	B 36 c	A 58 b	B 30 b
Clomazona	B 44 b	B 49 b	A 59 c	^{ns} 13 d	28 cd	14 c
Glifosato	A 86 a	B 52 b	A 92 ab	B 7 d	A 29 cd	B 3 c
Imazetapir	B 22 c	B 22 c	A 58 c	A 57 b	A 68 b	B 12 c
Cletodim	A 90 a	B 84 a	A 94 a	B 4 d	A 7 d	B 5 c
CV (%)	18	22	14	14	25	26

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e antecedida de mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

ns = não significativo ($p \geq 0,05$).

2.3.4 Controle alternativo em pré-emergência

O biótipo Joi apresentou baixa germinação das sementes mesmo na testemunha. Para o biótipo Col a menor germinação ocorreu quando utilizado o herbicida s-metalacloro, seguido de pendimentalina e imazapir+imazapique, semelhante ocorreu para o biótipo Susc (tab. 7).

Tabela 7 - Número de plantas emergidas de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódio avaliado aos 10 dias após a semeadura. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Tratamento	Nº de plantas emergidas		
	Col	Joi	Susc
Testemunha	A 5 a	B 1 ^{ns}	A 5 a
Imazapir + Imazapique	^{ns} 2 bc	1	3 bc
Pendimentalina	^{ns} 2 bc	0	2 cd
Clomazona	AB 4 ab	B 2	A 5 a
Metribuzim	^{ns} 4 a	2	4 ab
Atrazina	A 5 a	B 0	A 4 ab
S-metolacoloro	^{ns} 0 c	0	0 d
CV (%)	23	79	23

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e antecedida de mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

ns = não significativo ($p \geq 0,05$).

Controle satisfatório foi observado aos 10 dias após a semeadura para todos os herbicidas, e confirmado com a morte de todas as plantas germinadas após 17 dias da semeadura (tab. 8). Portanto, todos os herbicidas são eficientes para o controle do azevém, no entanto, nenhum deles é registrado para o mesmo, apenas a atrazina em mistura com nicossulfurom. Os herbicidas pré-emergentes são menos utilizados devido à preferência pelos herbicidas pós-emergentes, que normalmente possuem maior eficiência e principalmente alta seletividade às culturas. Em pós-emergência da cultura do trigo, por exemplo, as únicas duas moléculas registradas para o controle do azevém pertencem aos inibidores de ALS e ACCase, no entanto, como existem casos de resistência para ambos (HEAP, 2014), as alternativas vem a ser os pré-emergentes. Dessa forma, todos os herbicidas estudados se apresentam como alternativas para controlar o azevém resistente ao iodosulfurom. A utilização de múltiplos mecanismos de ação, como têm sido relatado para diversas espécies de plantas daninhas é uma ferramenta importante para reduzir e manejar a evolução de plantas daninhas resistentes (VENCILL et al., 2012). Além de diversificar os mecanismos de ação é importante utilizar herbicidas que são detoxificados por diferentes vias na planta (DÉLYE; JASIENIUK; LE COORE, 2013).

Tabela 8 - Controle (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódico avaliado aos 10 e 17 dias após o tratamento (DAT), em pré-emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Tratamento	10 DAT			17 DAT		
	Col	Joi	Susc	Col	Joi	Susc
Testemunha	^{ns} 0 d	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
Imazapir + Imazapique	^{ns} 83 b	83 a	77 a	90 a	90 a	100 a
Pendimetalina	^{ns} 83 b	100 a	87 a	100 a	100 a	100 a
Clomazona	^{ns} 98 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Metribuzim	^{ns} 80 b	95 a	73 a	100 a	100 a	100 a
Atrazina	B 70 c	A 100 a	AB 89 a	97 a	100 a	97 a
S-metolacoloro	^{ns} 98 a	100 a	98 a	100 a	100 a	100 a
CV (%)	5	7	16	5	4	3

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e antecedida de mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

ns = não significativo ($p \geq 0,05$).

2.4 Conclusões

Os biótipos de azevém resistentes ao iodosulfurom-metílico são controlados com doses entre 8-10 vezes maiores do que o suscetível e a redução de 50% da matéria seca dos biótipos resistentes ocorre com doses entre 6-8 vezes maior comparado ao suscetível.

O mecanismo de resistência não envolve a metabolização mediada pelas isoenzimas P450.

Os biótipos de azevém apresentam resistência cruzada para as sulfonilureias e imidazolinonas.

Os herbicidas glifosato e cletodim são alternativas em pós emergência para o controle do biótipo Col resistente ao iodosulfurom-metílico e apenas o herbicida cletodim para o biótipo Joi.

Todos os herbicidas pré-emergentes avaliados são opções para o controle dos biótipos de azevém resistentes aos inibidores da ALS.

3 CAPÍTULO II - Propriedades enzimáticas e mecanismo de resistência de azevém ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio

3.1 Introdução

A primeira enzima na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada é a acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetohidroxiácido sintase (AHAS). A enzima catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato para formar acetolactato (precursor de valina e leucina) e a condensação de piruvato e cetobutirato para formar aceto-hidroxibutirato (precursor de isoleucina) (SINGH; SHANER, 1995; DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008). A atividade da enzima ALS é regulada pela concentração final dos aminoácidos e sensível a inibição pelo grupo dos herbicidas inibidores da enzima ALS, como exemplo, a classe das sulfonilureias e imidazolinonas (CHIPMAN et al, 1998). Essas classes representam um mercado multibilionário de dólares, representando mais de 30% dos herbicidas registrados para o uso em todo o mundo (MCCOURT et al., 2006).

Os inibidores da enzima ALS são essenciais para o controle de amplo espectro de plantas daninhas, gramíneas e folhas largas, nas principais culturas agrícolas e possuem vantagens como não toxicidade aos animais, são altamente seletivos e requerem baixas taxas de aplicação por área (ENDO et al., 2013). A evolução da resistência de espécies daninhas a esses herbicidas tem se tornado preocupação em nível mundial, com o maior número de casos relatados comparado com os demais mecanismos de ação (HEAP, 2014). Entre as espécies, encontra-se o *L. multiflorum*, conhecido como azevém, importante planta daninha em cereais de inverno. Essa espécie tem evoluído como resistente aos inibidores da ALS em diversos países como Argentina, Brasil, Chile, Dinamarca, Itália e Estados Unidos (HEAP, 2014).

A maioria dos casos de resistência aos inibidores da ALS ocorre devido à alteração no local de ação do herbicida (TAN; PRESTON; WANG, 2007; YU; HAN; POWLES, 2008; DÉLYE et al., 2009; KALOUMENOS et al., 2012; KAUNDUN; DALE; BAILLY, 2012). Nesse caso, a substituição de um aminoácido muda a conformação da enzima impedindo ou limitando a ligação do herbicida (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008). A maior parte dos estudos demonstra não haver mudanças drásticas na afinidade da enzima pelo substrato (K_m) em biótipos resistentes, mas que eles mudam a sensibilidade da enzima ALS à inibição por retroalimentação dos aminoácidos de cadeia ramificada, resultando em acúmulo desses aminoácidos (EBERLEIN et al., 1997; PRESTON et al., 2006; ASHIGH; TARDIF, 2007). Como consequência, essa alteração na concentração de aminoácidos pode alterar o metabolismo da planta durante seu ciclo de vida (ASHIGH; TARDIF, 2007) como também representar custo de adaptação que mantém os alelos mutantes em baixas frequências em populações não tratadas (PRESTON et al., 2006). Biótipos de *L. rigidum*, cada um com específica mutação na enzima, apresentam crescimento das plantas e funcionalidade da enzima com pouca alteração e essas quando ocorrem dependem do tipo de substituição envolvida na resistência (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

A atividade catalítica da enzima ALS é regulada pela concentração final dos produtos da biossíntese, os aminoácidos (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008). Porém, a sensibilidade da enzima na regulação da retroalimentação pode ser influenciada pelas mutações que ocorrem em plantas resistentes ao inibidor (DUGGLEBY; PANG, 2000). A insensibilidade pela inibição por retroalimentação de alguns ou todos os três aminoácidos pode ser afetada pelo tipo de substituição que confere a resistência (EBERLEIN et al. 1997). A quantificação dos efeitos pleiotrópicos em plantas daninhas resistentes é necessária para o controle estratégico dessas espécies (MENCHARI et al., 2008).

A principal forma de controle de azevém continua sendo o químico, no entanto, com a rápida evolução da resistência cada vez mais são escassas as opções de moléculas disponíveis. Como não há previsão do lançamento de novos mecanismos de ação como alternativa de controle, o manejo das plantas resistentes, bem como o entendimento do mecanismo que confere a resistência, são importantes para impedir e/ou desacelerar a evolução da resistência.

Desta forma, o objetivo geral do trabalho foi caracterizar o local de ação dos herbicidas inibidores da enzima ALS de azevém comparando bioquimicamente plantas resistentes e suscetíveis ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio. Os objetivos específicos foram: 1) estabelecer alguns parâmetros para otimizar a atividade da enzima ALS em azevém; 2) investigar as propriedades cinéticas da enzima ALS 3) determinar a dose necessária para inibir 50% da atividade *in vitro* da enzima; e, 4) avaliar a atividade da enzima ALS sob retroalimentando dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal

Os experimentos foram realizados no laboratório Weed Science/Herbicide Chemistry do Soil and Crop Science Department (Texas A&M University - U.S.). Foram utilizadas sementes de biótipos resistentes de azevém oriundas da Carolina do Norte (NC) e Arkansas (AR) e um suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metilico sódio. Essas foram semeadas em substrato Fafard 2 MIX® em vasos com capacidade para 2 L. As plantas cresceram em câmara de crescimento sob condições controladas com 12 horas de fotoperíodo, temperatura de 22/18 °C e 250 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade de luz. As plantas foram irrigadas manualmente sempre que necessário. Em cada vaso foram mantidas 12 plantas, quando estas atingiram o estágio de 2 a 3 folhas foram cortadas, colocadas imediatamente em nitrogênio líquido para proceder com o ensaio enzimático.

3.2.2 Extração da enzima

O método de extração enzimática seguiu a metodologia proposta por Singh; Stidham; Shaner (1988) com modificações. A proporção de material vegetal (plantas) utilizadas para a extração foi previamente testada, com seis diferentes proporções de peso da amostra em relação ao tampão de extração, sendo elas: 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10 e 1/12 (p/v). Cada amostra de material vegetal foi composta de várias plantas, suficiente para obter o peso desejado. As plantas congeladas em nitrogênio líquido (N_2) foram maceradas até formar pó fino em almofariz e

homogeneizadas com o tampão de extração fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, a 4°C. O tampão foi preparado com: cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,5 mM; piruvato de sódio 10 mM; tiamina pirofosfato (TPP) 0,5 mM; flavina adenina dinucleotídeo (FAD) 10 μ M; glicerol 10% v/v; ditioneitol 1mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 5% (p/v). O homogeneizado foi mantido sob agitação por 20 minutos a 4°C, e após filtrado em duas camadas de gaze para remoção e descarte dos resíduos sólidos. Em seguida, centrifugado a 5.800 xg durante 80 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o resíduo sólido descartado.

3.2.3 Bioensaio “*in vitro*” com a enzima ALS

Os experimentos foram realizados em delineamento experimental completamente casualizado com três repetições. Para os bioensaios *in vitro* foram preparadas reações em tubos de ensaio, onde cada tubo recebeu 200 μ L da solução enzimática, o tampão de reação com diferentes concentrações do substrato (Experimento I), o tampão com diferentes concentrações do herbicida (Experimento II), tampão com diferentes concentrações de aminoácidos (III) ou apenas o tampão de reação em plantas que se desenvolveram em diferentes condições de temperatura e luminosidade, ambas para volume final de reação de 1 mL. Ao tratamento zero (testemunha), foi adicionado 50 μ L de solução H_2SO_4 3 M para impedir a atividade da enzima. Os valores de absorbância da testemunha foram utilizados para descontar dos valores das leituras dos demais.

Ao tampão de fosfato de potássio 75 mM, pH 7,5 para a reação foi adicionado: $MgCl_2$ 20 mM; piruvato de sódio 100 mM; TPP 2 mM; FAD 20 μ M, conforme metodologia proposta por Yu; Han; Vila-Aiub (2010), com modificações.

Após o preparo da reação, as amostras foram incubadas por 60 minutos a 35°C para a formação do acetolactato. A reação foi interrompida com adição de 50 μ L de solução de H_2SO_4 3M em cada tubo de ensaio, exceto no controle zero, que continha o ácido antes da incubação. A segunda incubação, por 15 minutos a 60°C, foi realizada para a formação da acetoína, a partir da reação do ácido sulfúrico com o acetolactato, formado durante a primeira reação. A etapa seguinte foi realizada para a formação do complexo colorido onde foram adicionados 1 mL de solução de creatina 0,5% p/v e 1 mL de α -naphtol 5% p/v, preparado em NaOH 2,5 M no momento do uso. Após a mistura, as amostras foram novamente incubadas por 15

minutos a 60°C, para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram então resfriados à temperatura ambiente e a absorbância lida em espectrofotômetro a 530 nm.

Os valores referentes à atividade da enzima ALS foram padronizados pela concentração de proteína, quantificada pelo método Bradford, e apresentados por quantidade de acetoína produzida ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), determinado pela curva padrão de acetoína (Fig. 5). Para a determinação da curva padrão de acetoína foram preparadas reações em tubos de ensaio, com três repetições. Cada tubo continha 200 μL de solução de acetoína nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM e completadas até 1 mL com água. Para a formação do complexo colorido foi adicionado em cada tubo 1 mL de solução de creatina 0,5% p/v e 1 mL de 1-naphtol 5% p/v, preparado em NaOH 2,5 M no momento do uso. Após, 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.

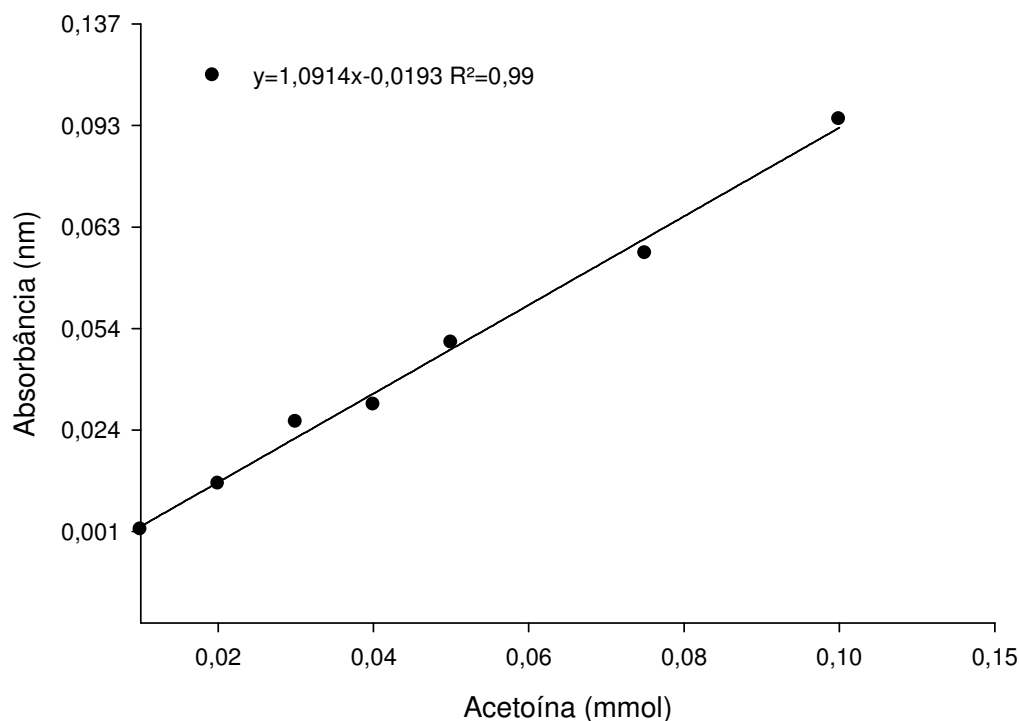


Figura 5 - Variação na absorbância em diferentes concentrações de acetoína. Texas A&M University, U.S., 2012.

Os primeiros testes foram realizados para determinar o tempo e temperatura da primeira incubação, pH da reação e concentração de fosfato no tampão de reação, sendo que para ambos os testes foi utilizado amostras do biótipo Susc.

Para determinação do tempo de incubação na formação do produto foram avaliados oito tempos: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos com temperatura de 30°C e pH 7,5. Para determinação da temperatura ideal para a primeira reação, foram realizadas incubações em oito temperaturas: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55°C com tempo de primeira incubação de 60 minutos e pH 7,5. As concentrações de fosfato para o estudo foram de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mM. Para avaliação do melhor pH para a reação, foram testados os valores de pH: 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8 com tempo de primeira incubação de 60 minutos e temperatura de 35°C. O tempo de incubação foi determinado pelo modelo linear ($p \leq 0,05$), que segue:

$$y = a + bx.$$

Onde, a= valor máximo estimado para a variável resposta; b= inclinação da reta e x= tempo de incubação. A temperatura de incubação, concentração de fosfato e o pH da reação foram ajustados ao modelo não-linear quadrático.

3.2.4 Experimento I. Determinações de K_m e V_{max}

Os parâmetros cinéticos da enzima como a constante de Michaelis (K_m) (concentração de substrato para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima da reação) e a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) informam a afinidade da enzima com o substrato. Para a obtenção do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ os ensaios foram realizados com diferentes concentrações do substrato. Nesse caso, o piruvato na extração não foi utilizado. Dez concentrações finais de piruvato foram utilizadas na reação: 0 à 100 mM para ambos os biótipos (resistente e suscetível). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram inicialmente determinados a partir da equação de Michaelis Menten ($p \leq 0,05$) (NELSON; COX, 2006), conforme segue:

$$y = V_{m\acute{a}x} * [S] / K_m + [S]$$

Onde, y = atividade da enzima ALS ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$); $V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima de reação; S = concentração do substrato (piruvato) e, K_m = concentração de substrato (piruvato) que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação. Para melhor representação a equação de Michaelis Menten foi linearizada resultando no gráfico de Lineweaver-Burke ou duplo recíproco, sendo o

ponto de intercepção entre a reta e o eixo das ordenadas equivalente a $1/V_{\max}$, e o ponto de intercepção entre a reta e o eixo de abcissas equivalente a $-1/K_m$, representado pela equação:

$$1/V = K_m/[S] + 1/V_{\max} \Rightarrow 1/V = K_m/V_{\max} * 1/[S] + 1/V_{\max}$$

Onde, V = é a velocidade da reação, K_m = é a constante de Michaelis-Menten, $V_{\max}$ = é a velocidade máxima da reação e $[S]$ = a concentração do substrato (piruvato). Os dados foram sujeitos à análise de variância usando o programa estatístico SAS 9.3 e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.5 Experimento II. Ensaio *in vitro* da enzima ALS na presença de herbicida

O segundo experimento teve por objetivo verificar se o mecanismo de resistência de azevém a herbicidas inibidores da enzima ALS é decorrente da insensibilidade da enzima ao herbicida. Os procedimentos da reação foram idênticos aos descritos no item 3.2.3.

A partir da solução estoque de 1000 μM do herbicida iodosulfurom-metílico foram feitas diluições para as concentrações de trabalho desejadas. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 100 μL da solução herbicida para uma concentração final de 0 à 100 μM para os biótipos resistentes (AR e NC) e 0 à 0,5 μM para o biótipo Susc. Os bioensaios tiveram dois tratamentos padrões sem o herbicida, denominados 0 (zero) e 100% (cem) de atividade, onde o primeiro recebeu 50 μL de solução de ácido sulfúrico 3 M no início do bioensaio e o segundo constou do tratamento-padrão, correspondendo a testemunha sem inibidor.

Os valores de absorbância foram corrigidos por meio da subtração do valor do controle zero. Os valores obtidos foram usados para calcular o I_{50} , o qual representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima, utilizando o modelo logístico de regressão não linear (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995). Foi determinado também o fator de resistência (FR), o qual foi calculado pela divisão do I_{50} do biótipo resistente pelo correspondente ao do biótipo suscetível. O FR expressa o número de vezes em que a dose necessária para inibir 50% da atividade da enzima do biótipo resistente é superior à dose que inibe 50% do biótipo suscetível (HALL et al., 1998).

3.2.6 Experimento III. Ensaio *in vitro* da enzima ALS na presença de aminoácidos

Para avaliar a inibição da enzima por retroalimentação dos aminoácidos, a análise da atividade foi realizada na presença de cada aminoácido (valina, leucina e isoleucina). Os procedimentos foram idênticos aos citados anteriormente (item 3.2.3), sendo que cada tubo recebeu diferentes concentrações de valina, leucina ou isoleucina. As concentrações finais do respectivo aminoácido em cada tudo foram de 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 mM. Os dados obtidos com os tratamentos de cada aminoácido foram submetidos à análise estatística separadamente e apresentados em porcentagem em relação ao tratamento sem a presença do respectivo aminoácido.

3.3 Resultados e Discussão

A análise de variância para os dados proporção de plantas em relação ao volume do tampão de extração demonstrou haver diferença entre os tratamentos. A comparação entre as médias evidenciou a proporção 1/10 p/v superior às demais, com maior produção de acetoína, sendo essa proporção, utilizada para os demais experimentos (Fig. 6). Considerando que a atividade da enzima foi realizada com o extrato bruto da enzima, essa proporção de plantas proporcionou extrato mais limpo, sendo que a proporção de 1/4 p/v tem sido adotada na maioria dos trabalhos com a espécie em estudo.

A partir dos dados com o tempo de incubação versus a quantidade de produto formado observa-se que a inclinação da reta corresponde à velocidade da reação (Fig. 7). Houve linearidade de resposta, ou seja, quanto maior o tempo de incubação, maior a quantidade de acetoína produzida. Até os 60 min a produção é linear, com grande produção de acetoína e, a partir dos 60 min a produção torna-se menos acentuada. A cada unidade de tempo de incubação a produção de acetoína aumentou $0,08 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Considerando que a maioria dos trabalhos utiliza tempo de incubação entre 45 e 60 min, optou-se por trabalhar com 60 min, sendo um tempo seguro para a quantificação do produto formado.

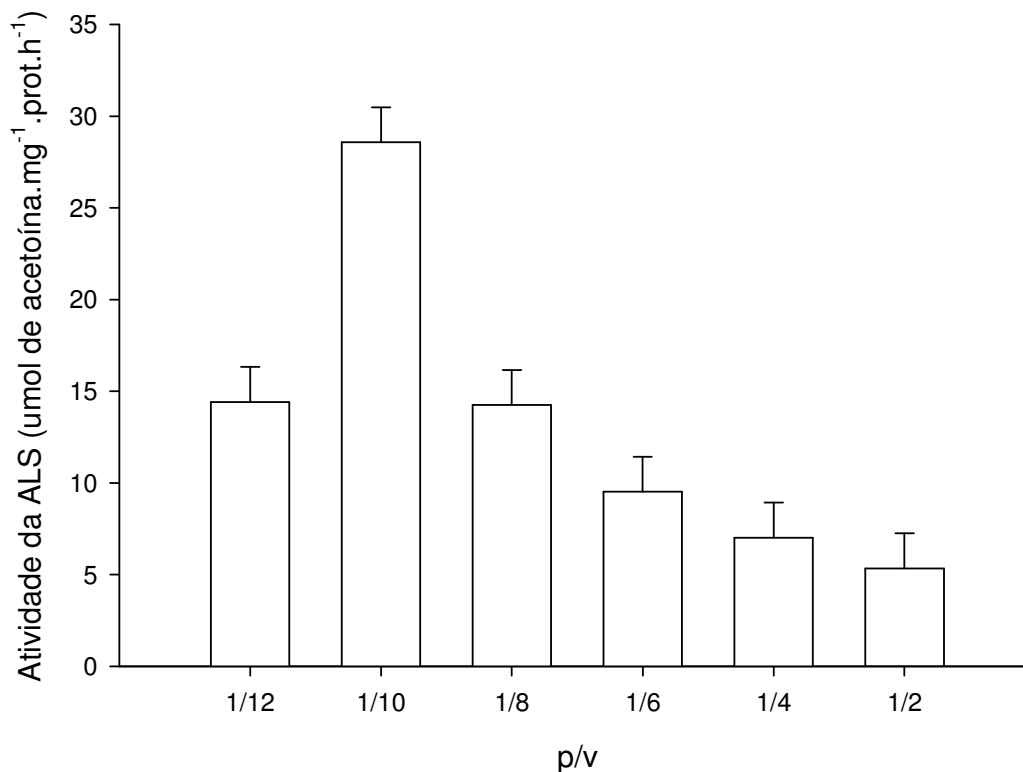


Figura 6 - Atividade da enzima ALS para diferentes proporções de planta em relação ao volume do tampão de extração. Texas A&M University, U.S., 2012. As barras indicam o erro padrão da média (Tukey 0,05).

Para a atividade da enzima em função de diferentes temperaturas, houve tendência de aumento da atividade com o aumento da temperatura e decréscimo em temperatura alta (Fig. 8). O ponto máximo de temperatura calculado através da equação foi de 42,5 °C, no entanto, temperaturas altas, acima de 40°C, podem alterar a cinética da enzima, como observado pela redução na sensibilidade da enzima para os aminoácidos leucina e valina (SINGH; STIDHAM; SHANER, 1988). Portanto, optou-se por trabalhar com temperatura intermediária de 35 °C.

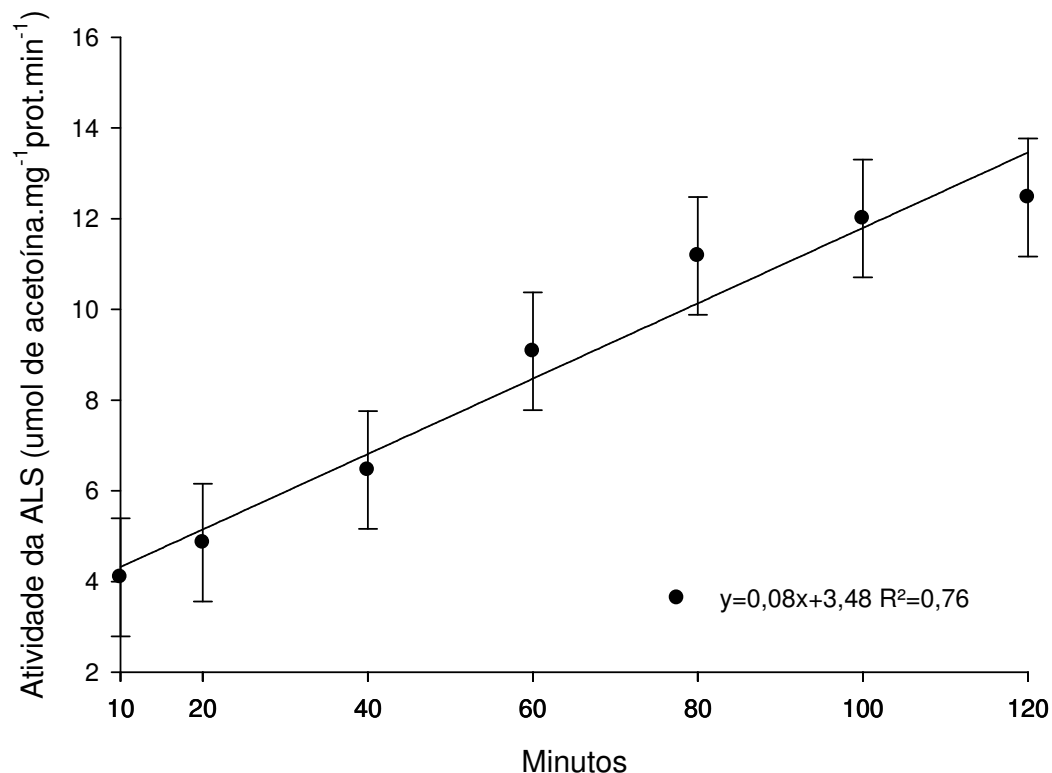


Figura 7 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoína em função do tempo de incubação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

A concentração de fosfato para o tampão de reação que permite a máxima atividade enzimática, calculado através da equação foi de 75 mM (Fig. 9). Concentrações entre 60 e 100 mM não diferem da concentração máxima pelo intervalo de confiança, assim, também podem ser utilizados.

O pH do tampão de reação para a máxima atividade enzimática, calculado através dos parâmetros da equação gerada com os dados foi de 7,5 (Fig. 10). A fonte utilizada para o tampão foi o fosfato de potássio, conforme a maioria das fontes pesquisadas para a espécie. De acordo com Singh; Stidham; Shaner (1988), para cada espécie a atividade ótima da enzima pode variar de acordo com a fonte utilizada, por isso é importante a otimização do pH para cada espécie.

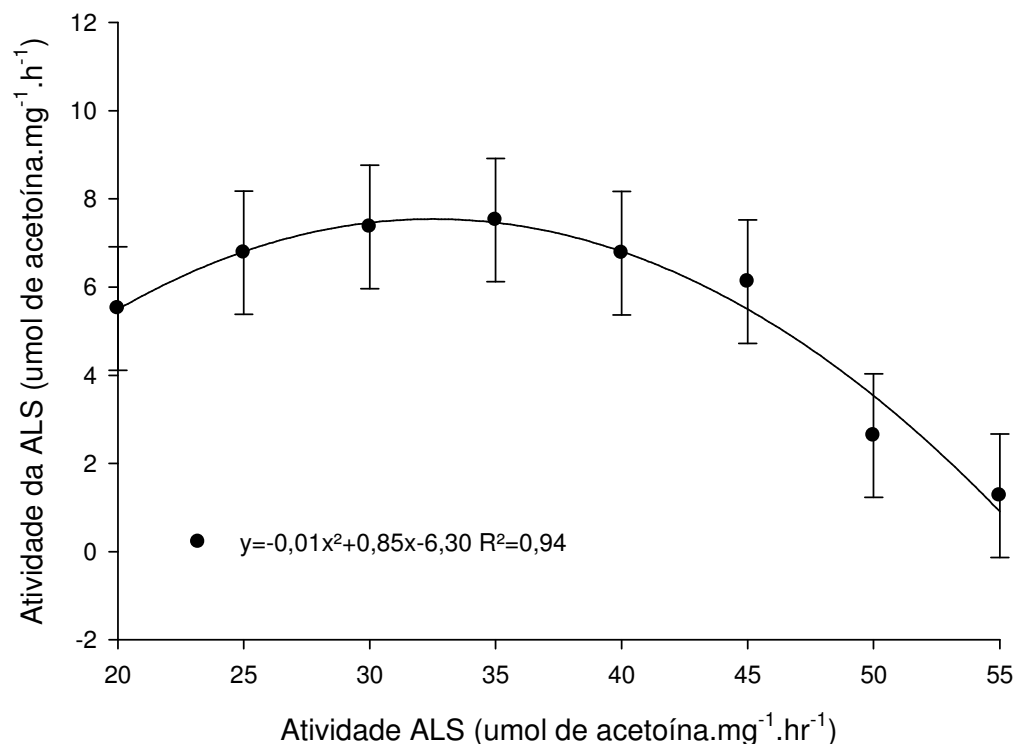


Figura 8 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoina em função da temperatura de incubação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

Nas condições de condução do experimento, foi possível determinar que as condições necessárias para atividade da enzima ALS de azevém são de 60 minutos de reação para a primeira incubação, temperatura de 35°C, concentração de fosfato no tampão de reação de 75 mM e pH da reação de 7,5.

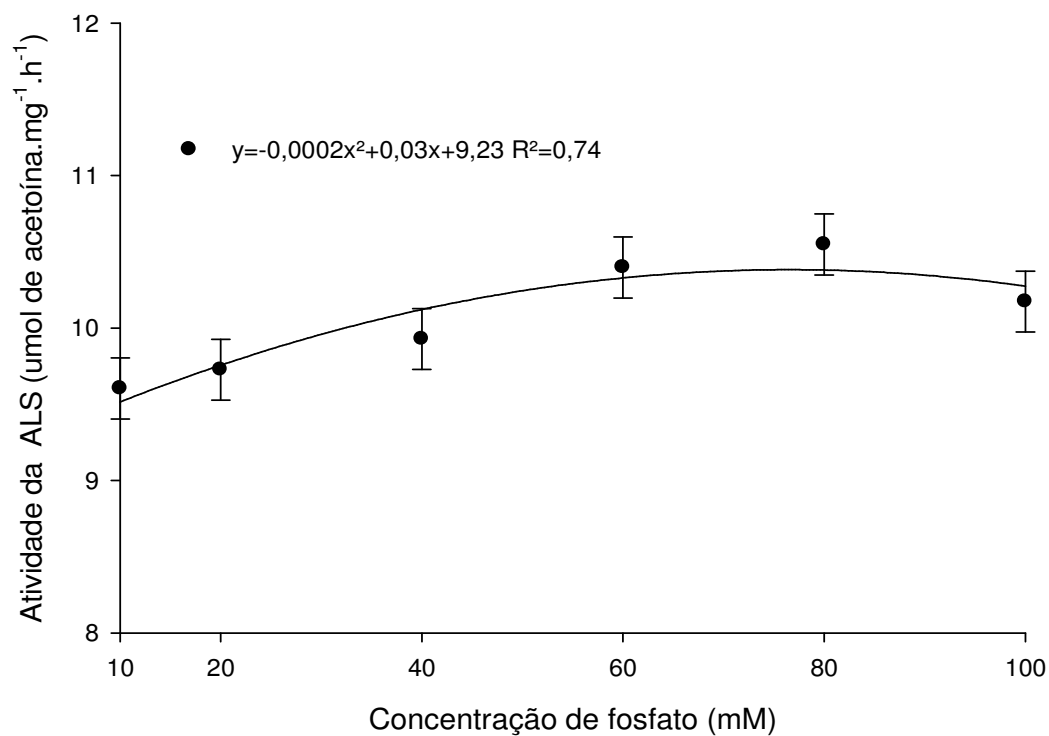


Figura 9 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoína em função da concentração de fosfato no tampão de reação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

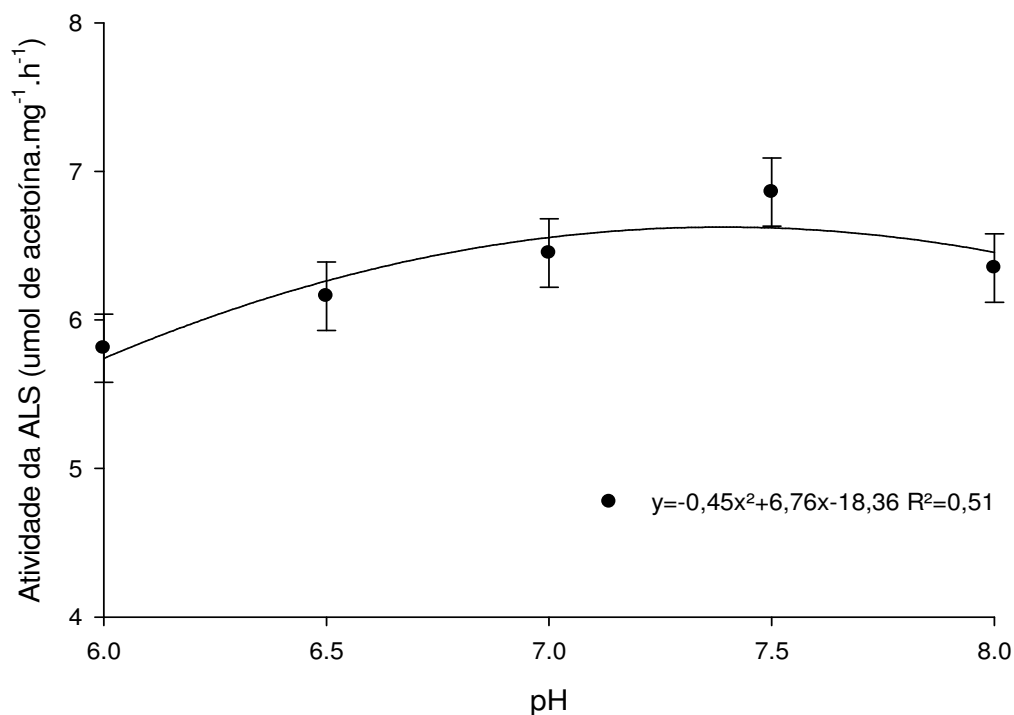


Figura 10 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de azevém expressa em produção de acetoina em função da variação do pH do tampão de reação. Texas A&M University, U.S., 2012. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

3.3.1 K_m e V_{max}

Os valores de K_m (piruvato) para os biótipos avaliados foram semelhantes entre si (Fig. 11 e tab. 9). Quando a resistência está associada à alteração no local de ação do herbicida este pode ou não representar mudança na funcionalidade da enzima, resultando em inalterado, insuficiente ou excessivo produto da biossíntese (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b). A magnitude da alteração depende do tipo de mutação na enzima, ou seja, certos aminoácidos alterados podem causar impactos adversos na ligação do substrato e assim, alterar a funcionalidade da enzima ALS (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Para o parâmetro V_{max} da enzima, os valores para os biótipos AR e NC foram semelhantes ao Susc (Fig. 11 e tab. 9). Esses resultados descartam a hipótese de provável resistência pelo mecanismo de superexpressão da enzima alvo.

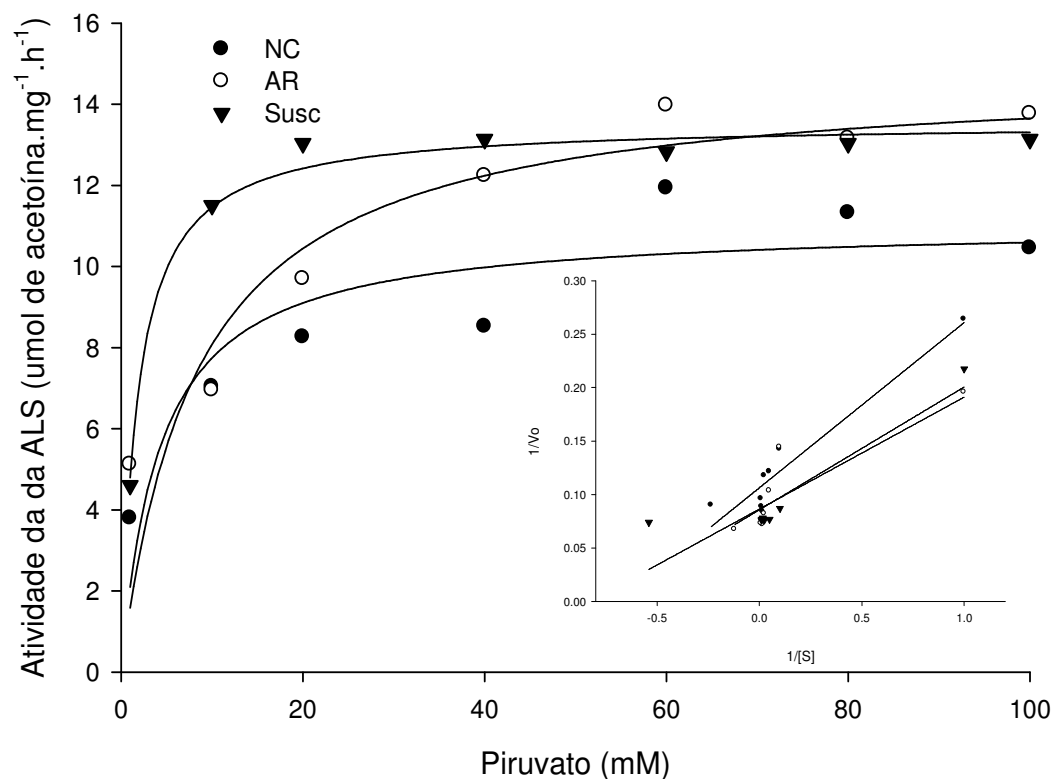


Figura 11 - Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de biótipos de azevém resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio expressa em produção de acetoina em função de diferentes concentrações de substrato (piruvato) e inverso dos valores da atividade e concentração, representando o duplo recíproco. Texas A&M University, U.S., 2012.

Tabela 9 - K_m (concentração de piruvato que fornece a velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação) e $V_{máx}$ (velocidade máxima da reação) de biótipos de azevém resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio. Texas A&M University, U.S., 2012.

Biótipo	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Susc	1,20	11,62
AR	1,35	11,76
NC	1,45	9,43

Tanto as sulfonilureias quanto as imidazolinonas obstruem o canal que leva ao sítio ativo da enzima. Qualquer alteração nesse canal, impede a ligação dos herbicidas, mantendo a conformidade da enzima e sua funcionalidade (MCCOURT et al., 2006). Em *Raphanus raphanistrum* e *L. rigidum* foram avaliadas populações homozigotas com diferentes tipos de mutações. A ocorrência de mudanças na

ecologia e fisiologia das plantas ocorre em poucos tipos de mutação, no entanto, são as mutações que ocorrem com menor probabilidade (LI et al., 2013; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Isso também explica o porquê da rápida evolução das plantas resistentes aos inibidores da ALS, pois são necessárias pequenas alterações para a resistência aos herbicidas sem, portanto, representar penalidade às plantas (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

3.3.2 Ensaio *in vitro* da enzima ALS na presença de herbicida

Os ensaios *in vitro* com a enzima ALS, para avaliar a atividade enzimática, demonstraram que é necessária uma dose de 0,001 μM do herbicida iodosulfurom para inibir 50% da atividade da enzima (I_{50}) no biótipo suscetível (Fig. 12). Quando comparado com os biótipos resistentes as doses foram de 0,779 e 0,395 μM para o AR e NC, respectivamente, resultando em relação de 779,1 e 395,1 vezes maior em comparação com o biótipo suscetível (tab. 10). Esses resultados confirmam a sensibilidade alterada da enzima ALS em biótipos resistentes. Quando esses mesmos biótipos foram analisados em casa de vegetação, foi necessária dose acima de 200 vezes, comparada ao suscetível, para reduzir 50% da massa seca (dados não apresentados). Quando populações de *L. rigidum*, isoladas com diferentes tipos de substituição de aminoácido foram avaliadas quanto à atividade da enzima observaram-se relações para o I_{50} entre resistente e suscetível (R/S) variando de 95 até >1333 vezes dependendo da localização e do tipo de aminoácido alterado (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

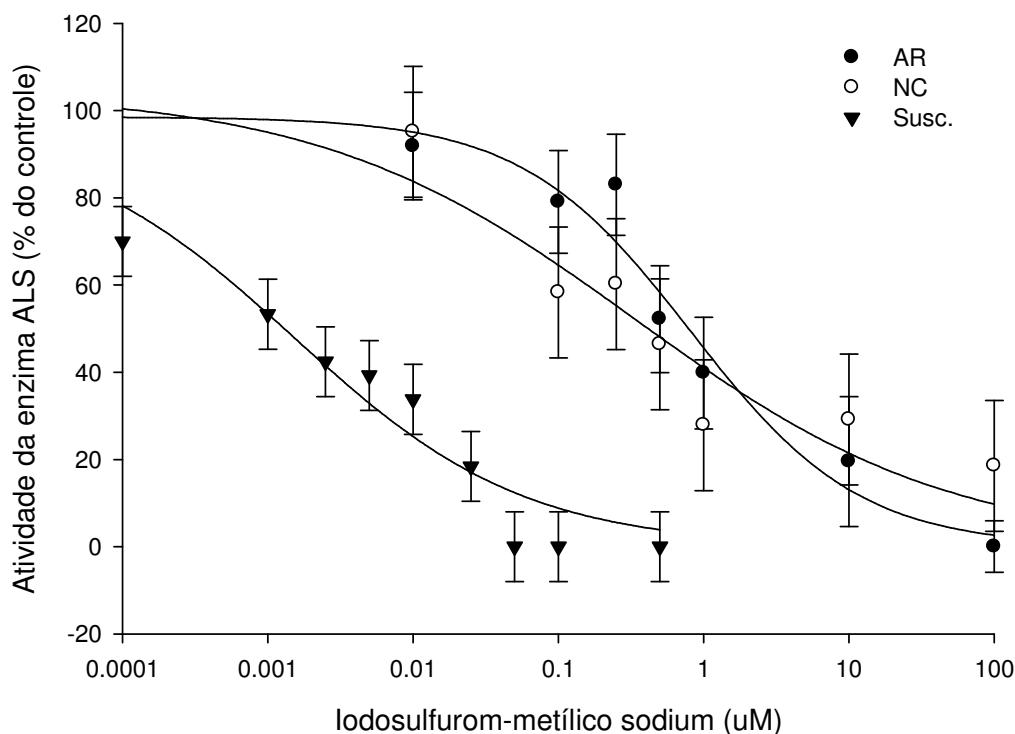


Figura 12 - Inibição *in vitro* da atividade da enzima ALS em biótipo suscetível e dois resistentes pelo herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

Tabela 10 - Equação sigmoidal logística, coeficiente de determinação (R^2), dose de iodosulfurom que inibe 50% da atividade da enzima ALS (I_{50}) e razão entre os biótipos resistente e suscetível (R/S), em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao iodosulfurom-metílico sódio, submetidos a diferentes doses do mesmo *in vitro*. Texas A&M University, U.S., 2013.

Biótipo	Equação	R^2	I_{50} (μ M)	R/S
Susc	$y=95,82/(1+(x/0,0015)^{0,54})$	0,94	0,001	-
AR	$y=98,56/(1+(x/0,81)^{0,75})$	0,95	0,779	779
NC	$y=104,33/(1+(x/0,33)^{0,39})$	0,88	0,395	395

3.3.3 Ensaio *in vitro* da enzima ALS na presença de aminoácidos

Houve interação entre biótipos e concentração dos aminoácidos, no entanto, os dados para os três aminoácidos não se ajustaram ao modelo matemático. Os biótipos resistentes (NC e AR) foram pouco sensíveis à inibição da atividade da

enzima na presença dos aminoácidos. Na presença de isoleucina (100 mM) a atividade para os biótipos resistentes foi superior a testemunha sem o aminoácido, sendo observada inibição de 31% na concentração de 0,01 mM para o biótipo AR (Fig. 13). Na presença do aminoácido leucina (100 mM) o biótipo AR diminuiu a atividade em 50% e o comportamento para o biótipo NC foi semelhante quando na presença de isoleucina, ou seja, atividade maior que a testemunha (Fig. 14). A maior inibição da atividade foi observada na presença de valina (100 mM) com diminuição de 94% na atividade do AR e 17% do NC (Fig. 15). O biótipo suscetível diminuiu a atividade em 50% na concentração de 0,1 mM de ambos os três aminoácidos, chegando a 100 % na presença de leucina (100 mM).

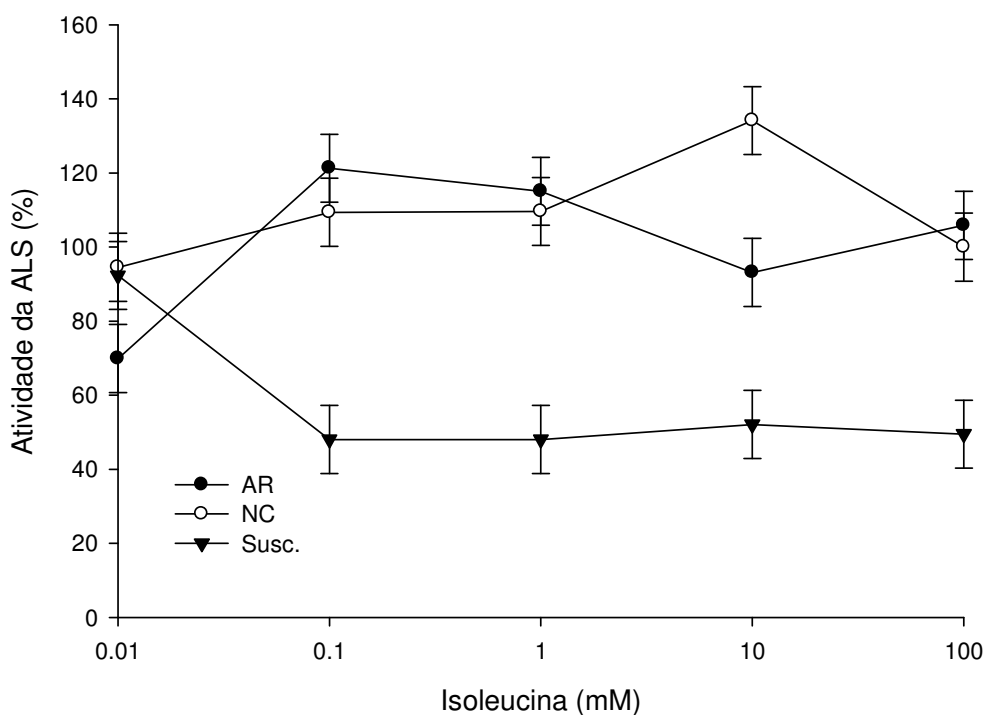


Figura 13 - Atividade da enzima ALS na presença de diferentes concentrações do aminoácido isoleucina em relação ao controle, sem a presença do aminoácido, em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

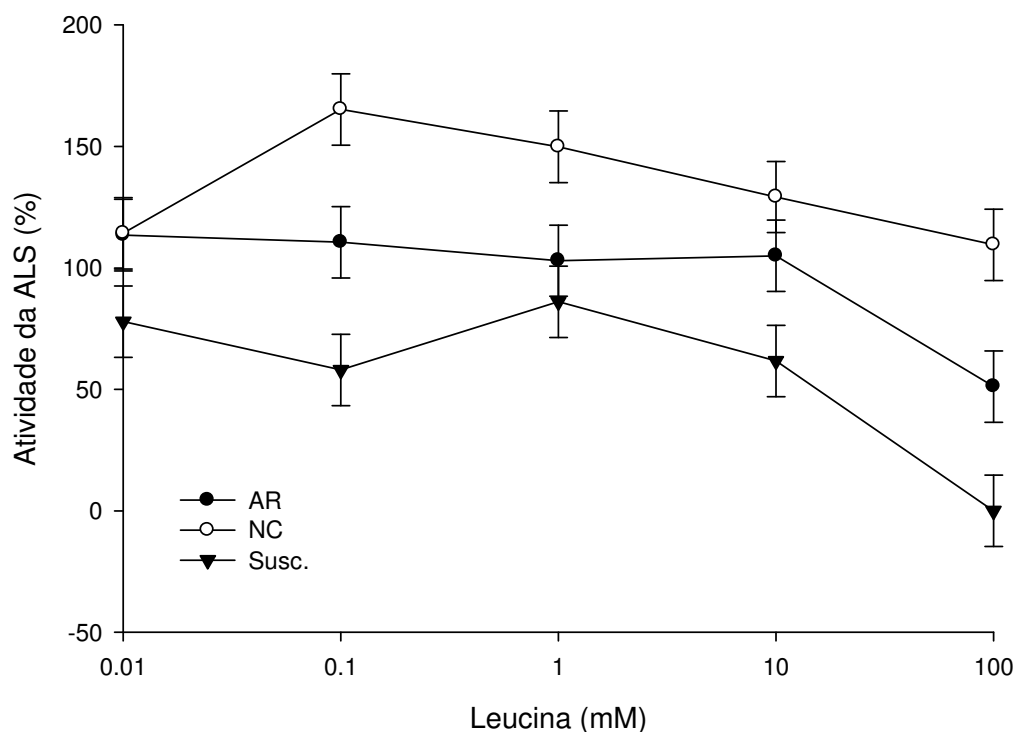


Figura 14 - Atividade da enzima ALS na presença de diferentes concentrações do aminoácido leucina em relação ao controle, sem a presença do aminoácido, em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

Quando há alteração na estrutura da enzima pode ocorrer desequilíbrio na produção de aminoácidos (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Para os biótipos resistentes talvez seja necessária concentração maior de aminoácido para a total inibição. Esses resultados confirmam que há alteração na enzima, pois possui menor sensibilidade à inibição por retroalimentação dos aminoácidos. Uma quantificação dos aminoácidos na folha seria necessária para confirmar os dados obtidos, sendo possível observar se ocorre ou não maior acúmulo dos mesmos. A resposta diferencial de biótipos à inibição por retroalimentação pode ser devido à alteração específica que causa a resistência e como consequência da menor sensibilidade à inibição ocorre o acúmulo dos aminoácidos (TANAKA, 2003). A atividade do biótipo resistente de *Lactuca serriola* com substituição Pro 197 para His no domínio A é menos sensível à inibição pelos aminoácidos valina, leucina e isoleucina comparado com o

biótipo sensível. Essa reduzida sensibilidade está correlacionada com maior concentração desses aminoácidos nas sementes do biótipo resistente (EBERLEIN et al., 1997).

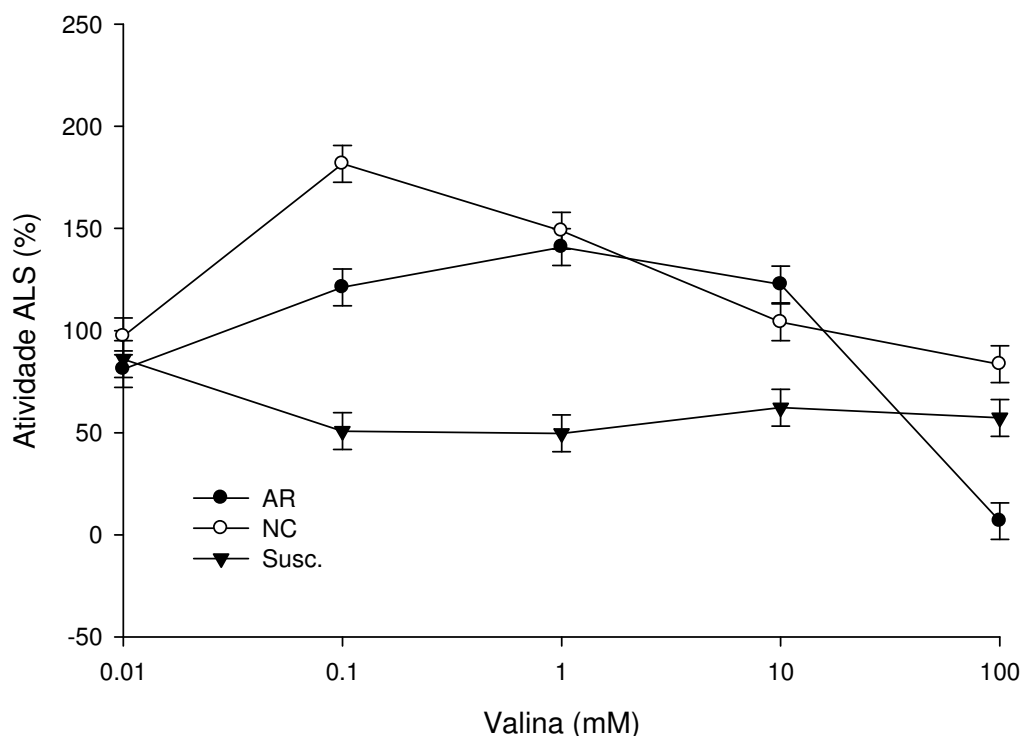


Figura 15 - Atividade da enzima ALS na presença de diferentes concentrações do aminoácido valina em relação ao controle, sem a presença do aminoácido, em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Texas A&M University, U.S., 2013. Os pontos representam os valores médios das três repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

A enzima ALS é dividida em duas subunidades, uma catalítica e outra reguladora. A reguladora estimula a atividade da subunidade catalítica e confere sensibilidade à inibição por realimentação dos aminoácidos de cadeia ramificada (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008). Em bactérias o aminoácido valina é o mais potente inibidor, já nas plantas a leucina atua sinergicamente com a valina ou isoleucina (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008). Em *A. thaliana* a enzima ALS é inibida com concentração de leucina e valina de 336 e 231 mM, respectivamente,

mas a inibição cai para 12,3 mM quando ambos são utilizados juntos (LEE; DUGGLEBY, 2001).

Existem dois sítios reguladores separados, um para leucina e outro para valina e isoleucina. Em bactérias quando as subunidades foram testadas separadamente, a subunidade catalítica foi insensível a inibição por valina, quando combinada com a subunidade reguladora, a atividade foi estimulada de 7-10 vezes e esta tornou-se sensível a inibição (PANG; DUGGLEBY, 2001). Em plantas a inibição da enzima pelos aminoácidos geralmente ocorre na ordem de potência leucina>valina>isoleucina. Em estudo com plantas de arroz com alteração na subunidade catalítica da enzima ALS ocorre alto grau de resistência e também resistência à inibição da enzima por retroalimentação dos aminoácidos (ENDO et al., 2013). Segundo os autores, uma hipótese para explicar o resultado é que a mutação na subunidade catalítica muda a conformação da enzima e inibe a ligação dos aminoácidos na subunidade reguladora.

O desequilíbrio de aminoácidos nas plantas pode modificar o comportamento fenotípico dos biótipos. Em *S. juncoides* a insensibilidade à inibição por valina, permite acúmulo desse aminoácido nas sementes e rápida germinação e crescimento durante períodos de baixas temperaturas (TANAKA, 2003). Mutações no mesmo gene podem apresentar diferentes efeitos pleiotrópicos, sendo muitos deles considerados mais como vantagem adaptativa das plantas do que custo propriamente dito (DÉLYE; JASIENIUK; LE COORE, 2013).

3.4 Conclusões

O K_m e V_{max} para os biótipos resistentes AR, NC são semelhantes ao suscetível

A resistência dos biótipos NC e AR decorrem da insensibilidade da enzima ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio.

Os biótipos resistentes AR e NC apresentam pouca sensibilidade à inibição por retroalimentação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

4 CAPÍTULO III - Velocidade de absorção e metabolização do herbicida iodosulfurom-metilico sódio em biótipos de azevém resistente e suscetível.

4.1 Introdução

A evolução de plantas daninhas resistentes aos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) é uma ameaça para a eficiência no controle dessas espécies em sistemas agrícolas. Os inibidores da ALS foram lançados no mercado em 1982, e desde então, já foram registradas 144 espécies de plantas daninhas resistentes a esses herbicidas (HEAP, 2014). Entre elas o *L. multiflorum*, registrado pela primeira vez em 1995, como resistente, na Itália. A partir de então já foram relatados casos nos Estados Unidos, Chile, Brasil, Dinamarca e Argentina (HEAP, 2014). No Brasil, os casos foram confirmados no ano de 2010 no estado do Rio Grande do Sul e existem casos relatados no Paraná e Santa Catarina (HEAP, 2014).

A insensibilidade da enzima é o mecanismo mais comum de plantas daninhas resistentes aos inibidores da enzima ALS (TRANEL; WHIRGH, 2002; CORBETT; TARDIF, 2006). Ocorre devido à mutação no gene ALS, diminuindo a afinidade da enzima ALS com os herbicidas (CORBETT; TARDIF, 2006). Em *L. rigidum*, estudos elucidaram alguns dos alelos mutantes no gene ALS que confere resistência dessa espécie aos herbicidas inibidores da ALS (TAN; PRESTON; WANG, 2007; YU; HAN; POWLES, 2008; DÉLYE et al., 2009; KALOUMENOS et al., 2012; KAUNDUN; DALE; BAILLY, 2012). De acordo com Tranel e Whirgh (2002), o aumento do metabolismo resultando em desintoxicação rápida do herbicida é o segundo mecanismo mais comum de resistência para os inibidores de ALS. Em *L. rigidum* esse mecanismo pode ser mediado pelas enzimas do grupo P450 (YU et al.,

2009). A dificuldade é que espécies como o *L. rigidum* podem adquirir mais de um mecanismo de resistência para o mesmo grupo de herbicidas, como exemplo, tanto devido à insensibilidade da enzima como pelo aumento da metabolização do herbicida (CHRISTOPHER; POWLES; HOLTUM, 1992).

Outros mecanismos de resistência também podem ser a causa da resistência de espécies aos inibidores da enzima ALS. Baixas concentrações de herbicida no local de ação podem ocorrer em virtude da redução no tempo de retenção do herbicida pela superfície da folha e redução da absorção e/ou translocação do herbicida pela planta, ou devido à ocorrência de fenômenos de sequestração em organelas celulares onde o herbicida permanece metabolicamente inativo (POWLES; HOLTUM, 1994). Redução na absorção e translocação diferencial do herbicida foram observadas em diferentes espécies resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS (CAREY et al., 1997; GALLAHER et al., 1999).

O processo mais comum de detoxificação do herbicida em plantas é a modificação química do composto para substâncias menos tóxicas, sendo essas exportadas do citosol para serem compartimentalizadas no vacúolo (COLEMAN; BLAKE-KLAFF; DAVIES, 1997). Outras formas de compartimentalização na planta envolvem a exportação para espaços extracelulares e deposição em lignina ou outros compostos da parede celular (COBB; READE, 2010). A transformação envolve uma ou mais enzimas e a taxa de transformação e tipo de metabólito formado dependem da espécie de planta (COLEMAN; BLAKE-KLAFF; DAVIES, 1997). Em *L. rigidum* a resistência ao clorosulfuron ocorre pelo aumento da inativação metabólica do herbicida devido à conjugação com glicose, comparada com o biótipo suscetível (COTTERMAN; SAARI, 1992). Esses resíduos podem permanecer na planta por períodos consideráveis, como vários dias após a aplicação (COLEMAN; BLAKE-KLAFF; DAVIES, 1997).

A necessidade de compreender as diferenças entre populações de plantas resistentes e suscetíveis aos herbicidas é importante para a adoção de práticas de manejo que desacelerem a evolução da resistência. Os biótipos a serem estudados foram avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* da enzima a qual revelou ser pouco sensível ao herbicida iodosulfurom para os biótipos resistentes comparado ao suscetível. Como hipótese tem-se que os biótipos possuem alteração na enzima alvo, mesmo assim objetiva-se investigar se mais que um mecanismo de resistência possa coexistir. De acordo com Ahmad-Hamdani et al. (2013), muitos estudos focam

apenas em estabelecer o mecanismo de resistência examinando somente a mutação no gene alvo, ignorando a possibilidade que outro mecanismo possa coexistir. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a velocidade de absorção e metabolização do herbicida iodosulfurom-metílico sódio em biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida.

4.2 Material e Métodos

Os biótipos utilizados no experimento são oriundos dos Estados Unidos e foram identificados como NC e AR, ambos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS, além de um biótipo suscetível (Susc). Os experimentos foram realizados no laboratório Weed Science/Herbicide Chemistry do Soil and Crop Science Department (Texas A&M University).

Um experimento inicial, de curva dose resposta, foi utilizado para identificar a dose do herbicida que promove 50% de controle (C_{50}) ou redução da matéria seca (MS_{50}) de ambos os biótipos. Como também o fator de resistência (FR), que corresponde à razão entre o C_{50} ou MS_{50} do biótipo resistente pelo correspondente do biótipo suscetível e expressa o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% do biótipo resistente é superior à dose que controla 50% do biótipo suscetível (HALL et al., 1998).

Foram utilizados vasos com capacidade de 500 mL, preenchidos com substrato Fafard 2 MIX® e arranjos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade experimental foi composta por uma planta. Foi utilizado o herbicida iodosulfurom-metílico (Autumn™) nas doses 0, 1,8, 2,6, 3,5, 7, 14, 21, 28 e 56 g i.a ha⁻¹, aplicado em estágio de 2-3 folhas, considerando 3,5 g i.a ha⁻¹ como a dose de registro. À calda de aplicação foi adicionado 1% v/v de óleo concentrado. A aplicação dos tratamentos foi realizada com auxílio de uma câmara de pulverização automática, calibrado para aplicar 200 L ha⁻¹ de calda herbicida. As variáveis avaliadas foram controle visual e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA). O controle foi avaliado aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), adotando-se a escala percentual, onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte de plantas, respectivamente. A MMSPA foi determinada após avaliação do controle pela secagem do material vegetal em estufa a temperatura de 60°C até atingir massa constante. Os dados obtidos foram analisados

quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Quando significativo, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear log-logístico e C_{50} e MS_{50} calculados a partir dos parâmetros da equação (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995). A análise de regressão foi realizada com auxílio do programa SigmaPlot 10.0 (SIGMAPLOT, 2007), ajustando-se os dados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico, ou polinomial quadrática, ou exponencial, conforme segue:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

$$y = a + bx + cx^2$$

$$y = a e^{(-bx)}$$

Onde: y = porcentagem de controle; x = dose do herbicida; e a , x_0 e b = parâmetros da equação, sendo que a é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva, x_0 é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e b e c a declividade da curva.

O fator de resistência (FR) foi calculado pela divisão do C_{50} ou GR_{50} do biótipo resistente pelos correspondentes ao do biótipo suscetível.

4.2.1 Preparação dos padrões e fortificação de amostras

Os reagentes utilizados foram padrão herbicida iodosulfurom-metílico sódio, com pureza de 99% obtido da Sigma. Acetonitrila (ACN), toluene e metanol com o padrão HPLC e água purificada utilizando o sistema Millipore Milli-Q Plus.

Para a preparação da solução estoque foi dissolvido 5 mg de iodosulfurom-metílico sódio em 10 mL de ACN. Uma solução de trabalho de 1000 ng mL⁻¹ também foi preparada. A curva de calibração foi feita a partir da solução de trabalho com sete diferentes níveis, numa amplitude de 0.01-1000 ng mL⁻¹. Para verificar a recuperação do método seis amostras foram enriquecidas com 100 µL da solução de trabalho 1000 ng mL⁻¹, antes da extração, todas atingiram recuperação acima de 85% (dados não mostrados).

4.2.2 Estabelecimento e condução dos experimentos

Foram realizados dois experimentos, um para determinar a velocidade de absorção do herbicida e outro para comparar a degradação do herbicida entre os biótipos. Para ambos os experimentos, biótipos de azevém com diferentes suscetibilidades ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio (NC e AR resistentes e Susc suscetível) foram semeadas em vasos com capacidade de 500 mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com luminosidade de 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22/18 °C. Quando as plantas apresentavam de 3-4 folhas procedeu-se a aplicação do herbicida iodosulfurom-metílico sódio (Autumn™), na dose de 3,5 e 56 g ia ha⁻¹, para o primeiro e segundo experimento, respectivamente. Foi adicionado à calda 1% de óleo concentrado.

4.2.3 Coleta das amostras

Para o experimento de velocidade de absorção foram realizadas 8 datas de coleta das amostras (0, 0,67, 0,5, 0,75, 1, 4, 8 e 10 horas após a aplicação do herbicida). Como procedimento da coleta, cada amostra (uma planta) foi mergulhada em 15 mL de água ultra pura e mantida em agitação durante 1 min. Logo após a retirada das plantas foi adicionado 5 mL de ACN na água. As plantas foram pesadas, para correção da massa seca, e as amostras de água mantidas em geladeira para no dia seguinte serem quantificadas em Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (UPLC). Antes da análise, as amostras foram passadas em filtro 0.2 μm PVDF. Um teste preliminar para observar a estabilidade do iodosulfurom em água, ACN e água+ACN (3:1), foi realizado. As amostras foram enriquecidas com o herbicida em zero, 1, 8 e 24 horas antes da análise, constatou-se que a recuperação foi acima de 90%. Portanto, não houve problema em degradação da amostra entre o dia da coleta até no máximo de 24 horas após, para a análise.

Para o estudo de degradação foram realizadas coletas das plantas aos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14 e 20 dias após a aplicação do herbicida, sendo cortadas rente ao solo e pesadas. Como procedimento da coleta, as amostras eram previamente lavadas com 20 mL de água ultra pura + metanol (3:1), repetido duas vezes e

mantido em agitação por 1 min. O material vegetal foi mantido em ultra freezer e a solução de lavagem em refrigerador até a extração e/ou quantificação.

4.2.4 Extração acelerada por solvente (ASE)

A extração do herbicida da planta foi realizada através de extrator acelerado por solvente (ASE) (Dionex 200), equipado com células de aço inoxidável (11 mL) e vials para a coleta de 20 mL. As condições de trabalho do ASE foram: 100% de ACN como solvente de extração; temperatura de 80°C; 1500 psi; 2 min de pré-aquecimento; 5 min de aquecimento; 2 ciclos estáticos com 3 min. cada; volume de flush, 60%; e 100 segundos de purga. As células foram preenchidas com 3 g de azevém (massa verde), macerado com nitrogênio líquido e 1 g de terra de diatomáceas (Chem Tube-Hydromatrix-Agilent Technologies), como agente secante.

Após a extração com o ASE as amostras foram centrifugadas a 2000 xg durante 30 min com objetivo de eliminar os resíduos sólidos. As amostras foram concentradas em evaporador de nitrogênio (TurboVap LV) até 1 mL em temperatura de 40°C. Esse 1 mL foi então filtrado em cartucho SPE (Supelclean™ Envi™ -Carb SPE tubes - 3 mL/25g) com o objetivo de limpar a amostras, eliminando principalmente a clorofila. A filtragem foi realizada com o auxílio de Vacuum manifold. O cartucho foi previamente condicionado com 6 mL de ACN-tolueno, 3:1, com fluxo de 5mL/min. Após o condicionamento as amostras foram passadas através da coluna. Após secar foram eluídas com 15 mL de ACN-tolueno, 3:1. As amostras foram então evaporada até secar e redissolvida com 1 mL de ACN. Antes da análise em UPLC foram passadas em filtro 0.2 µm PVDF.

4.2.5 Análise UPLC-MS

A identificação do iodosulfurom-metílico sódio foi realizado com o auxílio do UPLC Acquity® (Waters Corp., Milford, MA) que consiste em sistema de manejo do solvente binário, manejo da amostra e aquecimento da coluna. A coluna utilizada foi a Acquity BEH C18 (Waters Corp., Milford, MA) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), mantida a uma temperatura de 30°C. Para a fase móvel foram utilizados dois solventes, sendo 0,05% de ácido fórmico em H₂O (solvente A) e ACN (solvente B), com eluição isocrática (1:1), tempo de corrida de 3,5 min, fluxo de 0,4 mL min⁻¹ e volume de

injeção da amostra de 5 μL . Os dados foram processados com o software Empower 2 (Waters Corp., Milford, MA). Para a detecção do herbicida estava acoplado ao cromatógrafo o espectro de massa ACQUITY quadruplo tandem (Waters Corp., Milford, MA), com sonda de ionização ESI. As condições do detector foram voltagem da capilaridade de 3,0 kV, temperatura da fonte 150°C, temperatura da dessolvatação de 400°C, fluxo de gás na dessolvatação 800 L h^{-1} , fluxo de gás no cone 50 L h^{-1} e colisão 0,1 mL min^{-1} . Os gases utilizados para dessolvatação e cone foram o nitrogênio (AOC, Bryan, TX) e de colisão o argônio (AOC, Bryan, TX). As condições utilizadas para detectar o iodosulfurom foram: tempo de retenção médio de 0,922 min, modo de ionização positivo, precursor de íon 508,00 (m/z), fragmento íon 167,05 (m/z), voltagem do cone 30 (V) e energia de colisão 20 (eV).

A quantificação do herbicida em ng.mL^{-1} foi transformada para porcentagem em relação ao total de herbicida que atingiu a planta (data zero), no experimento de velocidade de absorção. Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) pelo programa SAS 9.3. Quando significativo, foram submetidos ao modelo de regressão linear utilizando o programa SigmaPlot 10.0. Para o experimento de degradação os dados obtidos em ng.mL^{-1} , foram transformados para porcentagem considerando 100% o total que atingiu a planta no momento da aplicação. Foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) pelo programa SAS 9.3. Quando significativo, foram submetidos ao modelo de regressão não linear sigmoidal, utilizando o programa SigmaPlot 10.0.

4.3 Resultados e Discussão

O teste de Shapiro Wilk demonstrou não ser necessário transformar os dados. Verificou-se interação para os fatores biótipos e doses para as variáveis controle visual e MMSPA aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. Ambas as variáveis ajustaram-se à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico (Fig. 16 e 17), exceto os biótipos NC e AR para a variável controle, os quais ajustaram-se à equação polinomial quadrática. A partir das equações, calcularam-se os valores do GR_{50} e C_{50} para os biótipos de azevém resistente e suscetível.

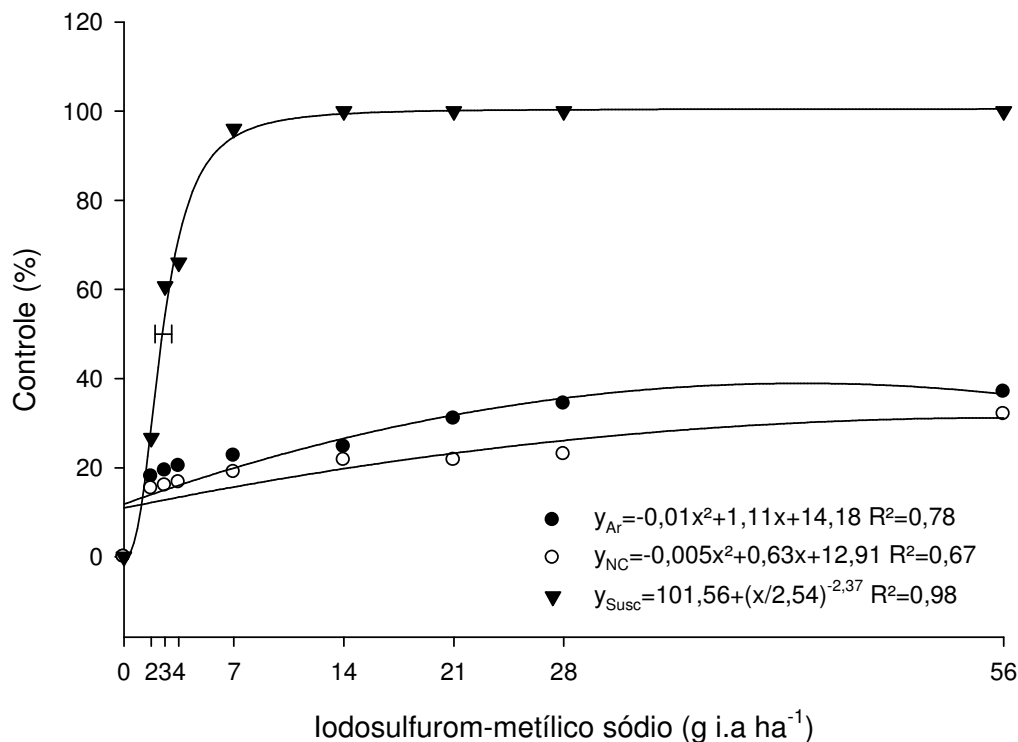


Figura 16 - Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após o tratamento. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e a barra horizontal representa o intervalo de confiança para a dose que causa 50% de controle do biótipo suscetível, com 95% de significância.

Para o biótipo Susc, aos 28 DAT, obtiveram-se valores de 50% de controle com o uso de 2,52 g i.a ha⁻¹ de iodosulfurom-metílico. Um controle de 90% desse biótipo foi atingido com a dose aproximada de 6 g i.a ha⁻¹. Mesmo essa dose sendo acima da registrada (3,5 g i.a ha⁻¹), a dose que o produtor normalmente utiliza varia entre 5 e 6 i.a ha⁻¹. Para os biótipos resistentes, na mesma época de avaliação, o controle foi inferior a 35%, em todas as doses utilizadas no experimento (Fig. 16). Em relação a MMSPA o GR₅₀ para os biótipos foram de 1,44, 415 e 610 g i.a ha⁻¹ para os biótipos Susc, AR e NC, respectivamente. Considerando o fator de resistência os valores foram de 288 para o biótipo AR e 424 para o biótipo NC. A máxima dose utilizada no experimento não foi suficiente para atingir controle de 100% dos biótipos resistentes, demonstrando alto nível de resistência.

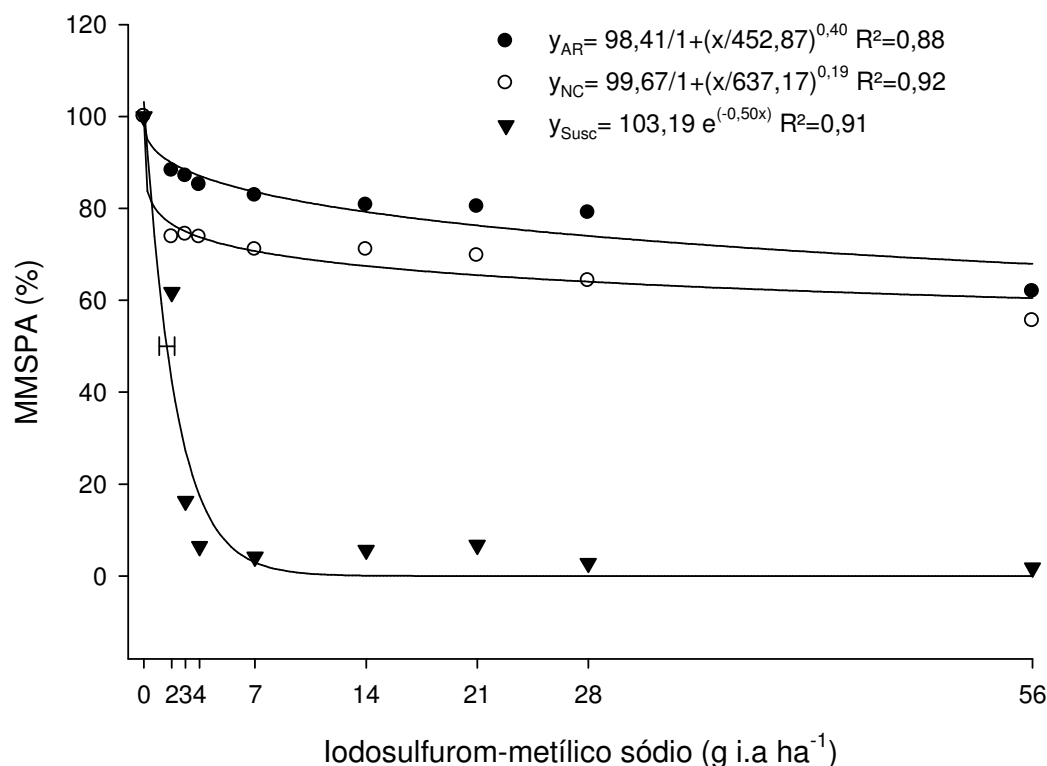


Figura 17 - Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (%) de biótipos de azevém, resistente (NC e AR) e suscetível (Susc.), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após o tratamento. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as três repetições e a barra horizontal representa o intervalo de confiança para a dose que causa 50% de controle do biótipo suscetível, com 95% de significância.

Para o experimento de velocidade de absorção a análise de variância revela que o teste F para a interação biótipo e tempo foi significativo ($\text{Prob}>F=0.0038$). De acordo com a análise de regressão os biótipos NC e Susc possuem velocidade de absorção do herbicida de 2,19 e 2,06 % por hora, respectivamente (Fig. 18). As doses não foram significativas para o biótipo AR e a absorção média foi de 11,6%. A máxima absorção foi encontrada às 10 horas para os biótipos NC (36,70%) e Susc (33,07%), ambos diferindo significativamente do biótipo AR. A menor absorção para o biótipo AR pode indicar mecanismo de resistência relacionado a menor absorção do herbicida. Em populações de azevém, no Mississippi, a tolerância ao glifosato ocorre pela absorção e translocação diferencial. A população T1 absorveu 43%

menos ^{14}C -glifosato comparado com a população suscetível (59% do aplicado) 48 horas após o tratamento (NANDULA et al., 2008).

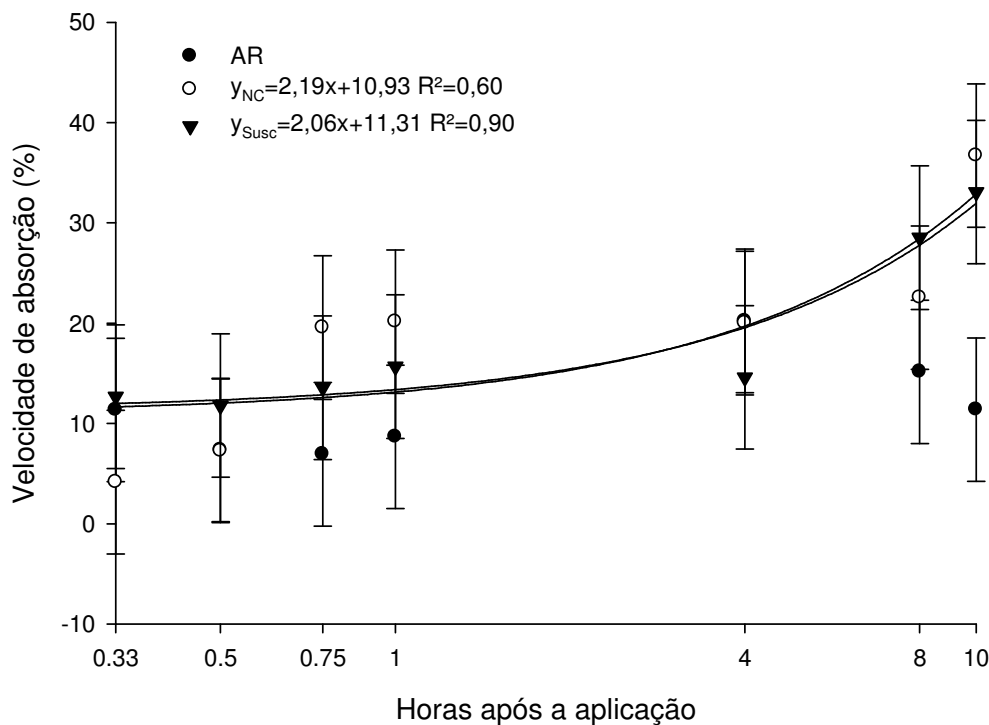


Figura 18 - Velocidade de absorção do herbicida iodosulfurom-metílico sódio em biótipos de azevém resistentes e suscetível ao herbicida, em horas após a aplicação. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as quatro repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

Para os dados de metabolização houve interação significativa entre biótipo e período após a aplicação. As diferenças entre biótipos foram observadas até 6 dias após a aplicação do herbicida, com menor metabolização para o biótipo Susc (Fig. 19). Pela equação é possível calcular o tempo necessário para os biótipos degradarem 50% do herbicida, sendo que os valores encontrados foram de aproximadamente 1 dia para ambos os biótipos resistentes e 4 dias para o biótipo Susc. Entre os biótipos resistentes houve diferença aos 1 e 2 dias, sendo que no primeiro dia a degradação foi maior para o biótipo AR (46%), comparada ao NC (37%) e, aos 2 dias 87% e 79% para os biótipos NC e AR, respectivamente. A degradação acima de 90% foi alcançada aos 9 dias para o biótipo Susc, no entanto,

esse longo tempo para a metabolização tem como consequência a morte da planta, confirmado através do experimento de dose resposta (Fig. 16 e 17). Portanto, os biótipos resistentes possuem taxa de metabolização mais rápida comparada ao biótipo Susc. Considerando que o experimento de dose resposta demonstrou alto grau de resistência dos biótipos resistentes, é possível que além do maior metabolismo a insensibilidade da enzima também está presente.

Em trigo a tolerância ao clorosulfuron (inibidor da ALS) deve-se ao rápido metabolismo do herbicida, sendo que a meia vida do herbicida em folhas tratadas foi de 2 a 3 horas (SWEETSER; SCHOW; HUTCHINSON, 1982). Em *Kochia* insensível aos inibidores da ALS devido à insensibilidade da enzima, o metabolismo de ^{14}C clorosulfuron, entre o biótipo resistente e suscetível foi similar até 21 horas após a aplicação (SAARI; COTTERMAN; PRIMIANI, 1990). Em biótipos de azevém perene resistente e suscetível aos inibidores da ALS o mecanismo de resistência pelo rápido metabolismo não foi observado, pois após 24 horas da aplicação a porcentagem encontrada do herbicida foi de aproximadamente 70% para ambos os biótipos (SAARI et al., 1992). Em biótipos de *Avena* spp. resistentes ao diclofop-metílico, com conhecida mutação da enzima, foram encontrados níveis superiores de herbicida nos biótipos suscetíveis nos dois períodos avaliados, 48 e 72 horas após a aplicação (AHMAD-HAMDANI et al., 2013). Essa menor quantidade encontrada nos biótipos resistentes ocorre devido à mais rápida taxa de metabolismo comparada à população suscetível, sendo que esses dois mecanismos que coexistem conferem alto nível de resistência aos herbicidas inibidores da ACCase (AHMAD-HAMDANI et al., 2013).

De acordo com a análise de variância houve interação entre biótipo e período após a aplicação do herbicida quando analisado o herbicida recuperado na água de lavagem das folhas (Fig. 20). Os dados foram submetidos à análise de regressão e ajustados à equação polinomial inversa. Houve diferença apenas no primeiro dia de coleta da água, sendo que a menor recuperação foi encontrada para o biótipo AR (40%), comparado aos biótipos NC (73%) e Susc (72%). Já aos 2 dias após a aplicação a quantidade encontrado foi menor que 5% para os três biótipos. Observou-se que o tempo necessário para a total absorção do herbicida varia entre 24 e 48 horas após a aplicação, portanto, o tempo de 10 horas utilizado no experimento de velocidade de absorção foi insuficiente para comparar os biótipos. São necessários mais datas de coleta entre 10 e 48 horas para se obter melhor

comparação entre os biótipos. Comparando com o experimento de velocidade de absorção o resultado para o biótipo AR foi contraditório, pois a menor recuperação pode representar maior absorção do herbicida. Desta forma, verifica-se que a velocidade de absorção para o biótipo AR é lenta até 10 horas e rápida a partir de aproximadamente, 24 horas após, comparada com os demais biótipos. Para os biótipos NC e Susc a absorção é completada entre 1 e 2 dias após a aplicação.

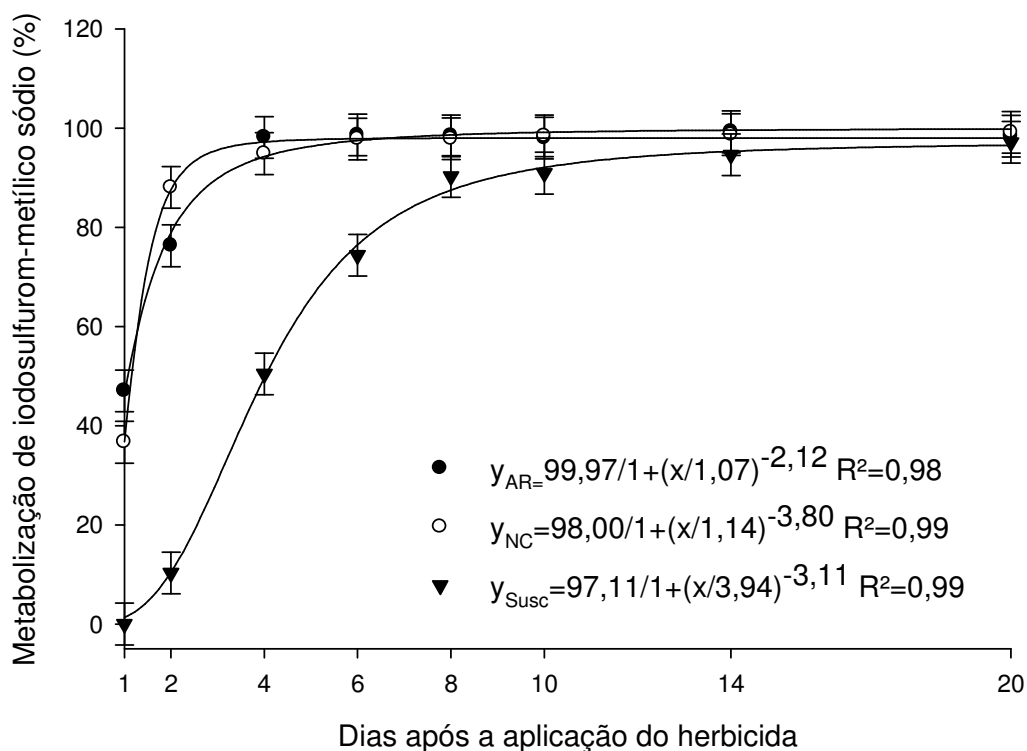


Figura 19 - Metabolização de iodosulfurom-metil sódio em biótipos de azevém resistentes (NC e AR) e suscetível (Susc) ao herbicida, entre 1 e 20 dias após a aplicação do mesmo. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as quatro repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

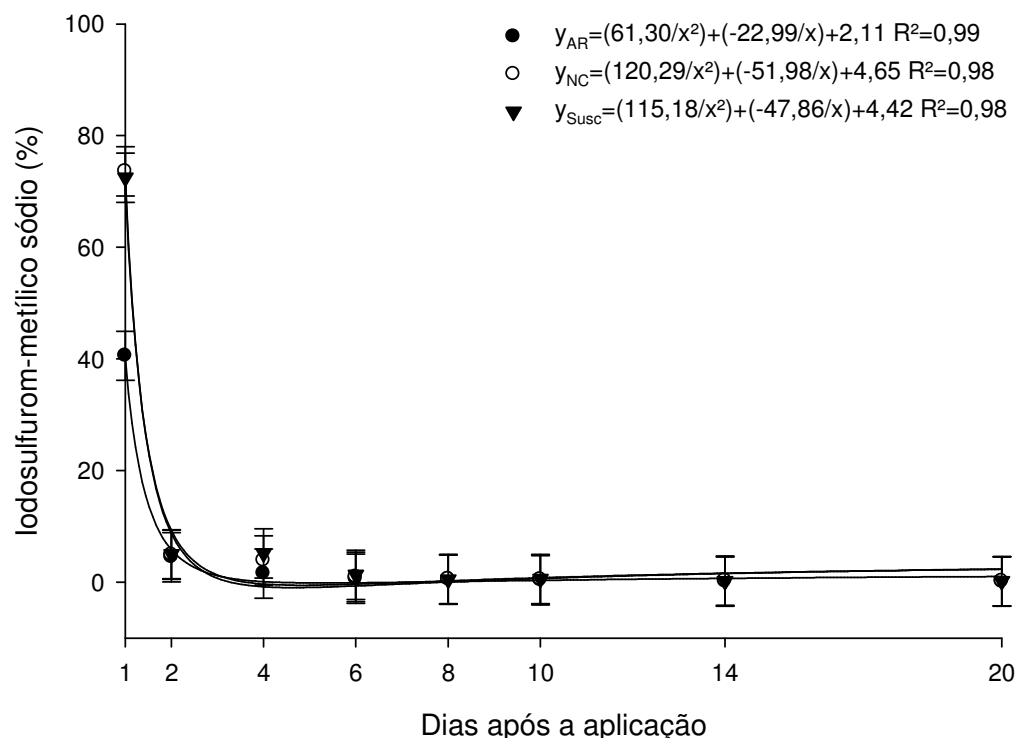


Figura 20 - Recuperação de iodosulfurom-metil sódio na água de lavagem das folhas em dias após a aplicação do herbicida. Os dados foram transformados em porcentagem considerando 100% o que atingiu a planta no tempo zero. Soil and Crop Science Department/Texas A&M University, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições, o ajuste da curva foi realizado com as quatro repetições e as barras verticais representam os intervalos de confiança.

Em *L. rigidum* 50% do clorosulfuron foi absorvido dentro de 48 horas após a aplicação, em ambos os biótipos, resistentes e suscetíveis (COTTERMAN; SAARI, 1992). Desta forma, acredita-se que absorção diferencial não é o mecanismo de resistência desses biótipos, pois o biótipo NC apresentou comportamento semelhante ao Susc e o biótipo AR absorveu mais rapidamente o herbicida. Em populações de azevém resistentes ao glifosato foram observadas diferenças entre duas populações resistentes, sendo uma devido à menor absorção do herbicida e a outra devido à translocação diferencial. A quantidade de herbicida que permaneceu na folha tratada foi significativamente maior em ambas as populações resistentes, comparada com a suscetível 48 horas após a aplicação. Ao analisarem a quantidade de cera epicuticular, não encontraram diferenças entre as populações (NANDULA et al., 2008).

4.4 Conclusão

Os biótipos resistentes AR e NC metabolizam mais rapidamente o herbicida comparado com o suscetível e não possuem mecanismo de resistência relacionado à velocidade de absorção do herbicida.

5 CAPÍTULO IV – Valor adaptativo de biótipos de azevém resistente e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio e habilidade competitiva com a cultura do trigo

5.1 Introdução

As práticas de manejo realizadas com o objetivo de eliminar as plantas daninhas exercem pressão de seleção influenciando a evolução de características adaptativas dentro da população (DÉLYE et al., 2013). Entre as características está a resistência, denominada como a habilidade herdada de uma planta em sobreviver à dose de registro do herbicida, que em condições normais, controlam o restante da população (VARGAS et al., 2009).

Com a evolução de populações de difícil controle, o valor adaptativo de alelos resistentes pode ser acompanhado da existência de custos de adaptação, sendo que estes efeitos pleiotrópicos podem ser negativos ou positivos em dado ambiente dependendo do alelo relacionado (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b; DÉLYE et al., 2013).

Um exemplo de alteração no valor adaptativo ocorre para a espécie de *L. rigidum*, com mecanismo de resistência devido ao aumento do metabolismo mediado pela P450, o qual possui reduzida taxa de crescimento relativa (TCR), taxa de assimilação líquida (TAL) e menor habilidade de competição (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a). Outro exemplo, são os biótipos de azevém suscetíveis ao herbicida glifosato os quais acumulam mais matéria seca, possuem maior capacidade de produção de sementes e apresentam maior capacidade competitiva que biótipos resistentes (VARGAS et al., 2005; FERREIRA et al. 2008). Portanto, as plantas se adaptam às mudanças e modificam a alocação dos recursos (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b).

O impacto da mutação que causa resistência aos inibidores da ALS depende do ponto da mutação e da espécie envolvida, podendo conferir maior efeito no crescimento de plantas e competitividade (TARDIF; RAJCAN; COSTEA, 2006) ou não representar nenhum efeito (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013).

Para analisar as características dos biótipos, frequentemente são utilizados estudos de crescimento, que detectam possíveis diferenças funcionais e estruturais entre biótipos (CHRISTOFFOLETI, 2001). Já, os experimentos em série de substituição são utilizados para estudar a competição inter e intraespecífica, ou seja, determinar o melhor competidor de duas espécies ou biótipos e entender como eles interagem (COUSENS, 1991). Nesse tipo de experimento a população total é mantida constante e a proporção entre as duas espécies é variável (HARPER, 1977). Com isso, é possível comparar as produtividades das associações com a do monocultivo e indicar qual genótipo ou espécie é mais competitiva (COUSENS, 1991). Biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas podem apresentar maior valor adaptativo comparado ao suscetível e, conseqüentemente, resultar em maior potencial de competição (ELLSTRAND, 1999).

Ressalta-se que a competição de plantas daninhas com as culturas tem sido considerada a principal causa biótica que gera perdas de produtividade (DÉLYE; JASIENIUK; LE COORE, 2013), chegando a 34%, em média, em todo o mundo (OERKE, 2006). Agravando o problema, a resistência de plantas daninhas aos inibidores da ALS tem evoluído rapidamente, confirmada pelo grande número de espécies registradas como resistentes (HEAP, 2014).

É evidente que na presença do herbicida o biótipo resistente possui vantagens em sobreviver comparado ao suscetível (DÉLYE; JASIENIUK; LE COORE, 2013). No entanto, como os biótipos resistentes possuem um mecanismo de resistência envolvido, quando na ausência do herbicida, os biótipos podem sofrer algum tipo de efeito pleiotrópico. Portanto, a caracterização de biótipos resistentes e suscetíveis aos inibidores da ALS é importante para a compreensão do comportamento desses biótipos no ambiente e para propor práticas de manejo que reduzam a evolução da resistência. Portanto, os objetivos do estudo foram identificar e comparar valores adaptativos dos biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida iodosulfurom-metílico e avaliar a habilidade competitiva entre os biótipos de azevém resistente ou suscetível e desses com trigo.

5.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, pertencentes à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no Município de Capão do Leão - RS. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições, sendo conduzidos entre os meses de agosto a novembro de 2011.

No primeiro experimento cada unidade experimental foi composta por vasos com capacidade de 8 litros e diâmetro de 23 cm e preenchidos com solo classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico solódico, pertencente à unidade de mapeamento Pelotas (EMBRAPA, 2006). A correção da fertilidade do solo foi realizada pela análise do solo, conforme as recomendações para a cultura do trigo (SOCIEDADE, 2004).

Os tratamentos constaram de plantas de biótipos resistente (Joi) e suscetível (Susc), de azevém ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio e de oito épocas de coletas das plantas (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após a emergência - DAE). O biótipo Joi foi oriundo da cidade de Jóia (latitude de 28° 38' 51" e longitude de 54° 07' 21") e o Susc da cidade de Pelotas (latitude 31° 48' 04" e longitude 52° 24' 50").

As variáveis avaliadas, em cada coleta, foram estatura de plantas (EST), área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (folhas+caules). A AF foi determinada com medidor de área foliar, Modelo LI-3100C. A MMSPA foi quantificada pela secagem do material vegetal em estufa, a temperatura de 60°C, até atingir massa constante.

Foram calculadas variáveis indiretas como: a taxa de crescimento absoluto (TCA) em g dia⁻¹, usada para medir a velocidade média de crescimento ao longo do período de observação, através da fórmula:

$$TCA = (MMSPA_2 - MMSPA_1) / (T_1 - T_2)$$

Onde, MMSPA₁ e MMSPA₂ é a variação da MMSPA em duas amostras consecutivas tomadas nos tempos T₁ e T₂; taxa de crescimento foliar relativo (TCFR) em g g dia⁻¹, representa o aumento de AF em determinado período de tempo, obtida através da equação:

$$TCFR = (\ln AF_2 - \ln AF_1) / (T_2 - T_1)$$

Onde, $\ln$ é o logaritmo neperiano, AF_2 e AF_1 representa a AF nos tempos T_1 e T_2 ; razão de área foliar (RAF) em $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$, expressa a AF útil para a fotossíntese, obtida através da fórmula:

$$\text{RAF} = (AF_1 + AF_2) / (\text{MMSPA}_1 + \text{MMSPA}_2)$$

Também foi calculada a taxa assimilatória líquida (TAL) em $\text{g cm}^2 \text{dia}^{-1}$, representa a capacidade da planta em aumentar sua MMSPA em função de sua superfície assimilatória, em determinado período de tempo, calculada através da fórmula:

$$\text{TAL} = (\text{MMSPA}_2 - \text{MMSPA}_1) (\ln AF_2 - \ln AF_1) / (AF_2 - AF_1) (T_2 - T_1)$$

(MAGALHÃES, 1979).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). No caso de ser constatada significância estatística, realizou-se a análise de regressão para o fator épocas de avaliação utilizando o programa SigmaPlot 10.0 (SIGMAPLOT, 2007), para todas as variáveis.

Para as variáveis EST, AF, MMSPA, TCA e RAF os dados foram ajustados à equação exponencial que se concluiu como a mais adequada:

$$y = a \cdot e^{b \cdot x}$$

Onde, y = variável resposta de interesse; x = número de dias acumulados; e = função exponencial; a e b = parâmetros estimados da equação, sendo a a diferença entre os pontos máximo e mínimo da variável, e b a declividade da curva.

Os dados da variável TCFR foram ajustados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico, conforme segue:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

Onde, y = representa a taxa de crescimento; x = dias após a emergência; a , x_0 e b = parâmetros da equação, sendo que a é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva, x_0 dias que proporciona 50% de resposta da variável e b é a declividade da curva.

Para avaliar a habilidade competitiva entre azevém e a cultura do trigo foi conduzido estudo composto por dois experimentos. Ambos os experimentos foram realizados em vasos, capacidade volumétrica de 1 L e diâmetro da superfície de 17,5 cm. O tipo de solo e correção foram idênticos ao descrito anteriormente.

O primeiro experimento foi realizado para determinar a população de plantas (m^2) a partir da qual a MMSPA por unidade de área torna-se independente da

população, de acordo com a “lei de produção final constante” (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 1997). Foram testadas as populações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 plantas vaso⁻¹ (equivalentes a 42, 83, 167, 333, 667, 1333, 2667 e 5333 plantas m⁻²). Foram utilizadas sementes da cultivar de trigo FUNDACEP Horizonte e sementes de azevém Susc e Joi, os mesmos descritos anteriormente.

A variável MMSPA foi quantificada aos 60 DAE pela pesagem da parte aérea das plantas após serem secas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 72 horas. Para análise dos dados, foi utilizada a produção recíproca para determinar a população de plantas onde a MMSPA torna-se constante. De acordo com os resultados, a população de plantas em que a MMSPA tornou-se independente da população, na média das espécies, foi de 1992 plantas m⁻², equivalente a 48 plantas por vaso (dados não apresentados).

O segundo experimento foi conduzido com o intuito de determinar a habilidade competitiva dos biótipos de azevém com o trigo, sendo utilizado população de 48 plantas por unidade experimental, determinada no experimento de monocultivo. Os tratamentos constaram de proporções dos biótipos de azevém Susc e Joi e da cultivar de trigo FUNDACEP Horizonte. As proporções testadas foram: 100:0 (estande puro do trigo), 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100% [estande puro do biótipo de azevém (resistente ou suscetível)]. A semeadura foi realizada em densidade superior às populações desejadas em cada tratamento e 10 DAE foi realizado desbaste para retirada do excesso de plantas.

As variáveis avaliadas foram AF e MMSPA aos 60 DAE, determinadas como descrito anteriormente. Para análise dos dados foi utilizado o método da análise gráfica da produtividade relativa (PR) (RADOSEVICH, 1987; COUSENS, 1991). Quando a PR resultou em linha reta, a habilidade da espécie ou biótipo em interferir sobre a outra é equivalente. Quando a PR resultou em linha côncava, ocorre prejuízo no crescimento de uma ou de ambos os competidores. Quando a linha apresentada pela PR foi convexa, há benefício no crescimento de um ou de ambos os competidores. A produtividade relativa total (PRT) sendo igual a um (linha reta) significa que ocorre competição pelo(s) mesmo(s) recurso(s); sendo superior a um (linha convexa), não ocorre competição, devido ao suprimento de recursos superar a demanda ou porque as espécies possuem diferentes demandas pelo(s) recurso(s) do meio e, quando inferior a um (linha côncava) significa ocorrer antagonismo, havendo prejuízo mútuo ao crescimento de ambas as espécies (COUSENS, 1991).

Os índices de competitividade relativa (CR), os coeficientes de agrupamento relativo (K) e os de competitividade (C) foram calculados na proporção de 50% dos competidores. A CR representa o crescimento comparativo do biótipo (1) (azevém resistente ou suscetível) em relação ao competidor (2) (trigo); K indica a dominância relativa de uma espécie ou biótipo sobre a outra e C aponta qual espécie ou biótipo manifesta-se mais competitiva (COUSENS, 1991). A interpretação conjunta desses valores indica com maior segurança a competitividade das espécies ou biótipos envolvidos. A espécie X é mais competitiva que Y quando $CR > 1$, $K_x > K_y$ e $C > 0$; por outro lado, a espécie Y é mais competitiva que X quando $CR < 1$, $K_x < K_y$ e $C < 0$ (HOFFMAN; BUHLER, 2002). Para calcular esses índices foram usadas as proporções 50:50 das espécies, utilizando-se as seguintes equações: $CR = PR_x/PR_y$; $K_x = PR_x/(1-PR_x)$; $K_y = PR_y/(1-PR_y)$; $C = PR_x - PR_y$. (COUSENS; O'NEILL, 1993). Os índices CR, K e C foram considerados diferentes, quando no mínimo em duas proporções, ocorreram significâncias pelo teste t (BIANCHI; FLECK; LAMEGO, 2006).

Para a análise estatística da PR, primeiro foram calculadas as diferenças para os valores de PR obtidos nas proporções de 25, 50 e 75% de plantas, em relação aos valores pertencentes às retas hipotéticas que foram obtidas nas respectivas proporções (PASSINI; CHRISTOFFOLETI; YADA, 2003). O teste t ($p \leq 0,05$), foi utilizado para testar as diferenças nos índices estimados em relação à reta hipotética (PASSINI; CHRISTOFFOLETI; YADA, 2001; HOFFMAN; BUHLER, 2002).

Os resultados obtidos para AF e MMSPA das plantas de azevém resistente e suscetível e trigo, expressos em valores médios por planta, foram submetidos à análise de variância. Quando o teste F indicou significância ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$), considerando-se as respectivas monoculturas como testemunhas.

5.3 Resultados e Discussão

O teste de Shapiro Wilk demonstrou não ser necessária a transformação dos dados para o experimento de valor adaptativo. Verificou-se interação entre os fatores biótipo e época de avaliação para todas as variáveis, exceto para a variável TAL onde se verificou efeito principal de biótipo.

A EST dos biótipos aumentou exponencialmente com o avanço das épocas de avaliação (Fig. 21). Considerando o coeficiente exponencial das equações o comportamento entre os biótipos foi similar, porém o biótipo Joi apresentou maior EST a partir dos 40 DAE, a exceção dos 60 DAE. Resultados semelhantes foram encontrados para biótipos de azevém com resistência de baixo nível e suscetível ao fluazifop (FRAGA et al., 2013).

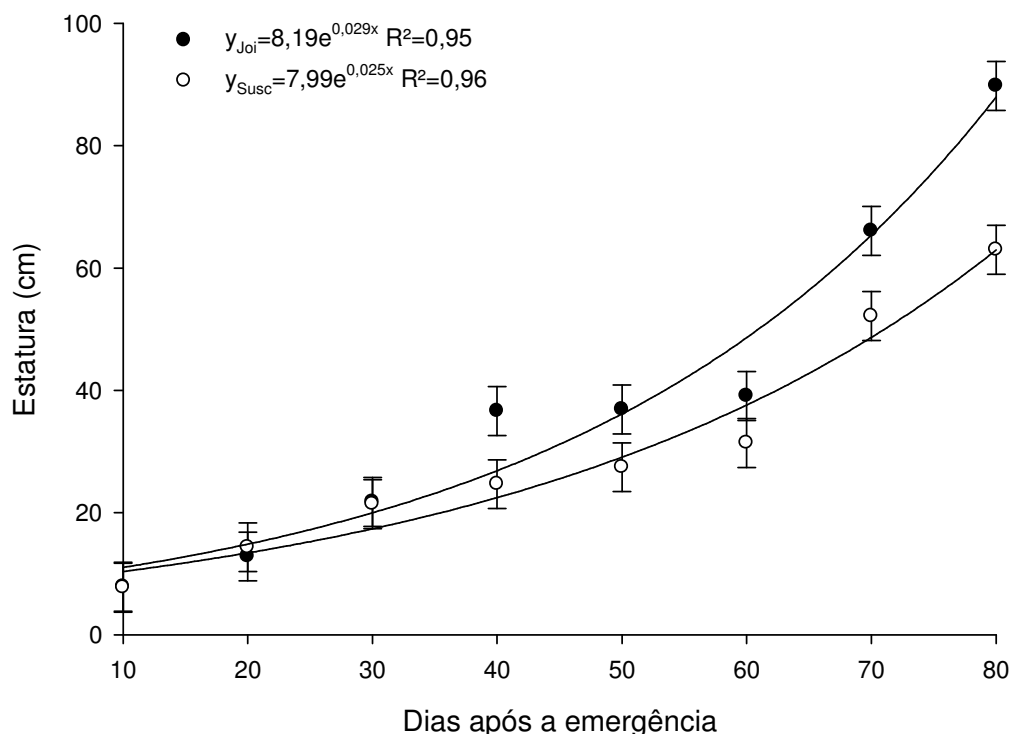


Figura 21 - Estatura (EST) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.

Em relação à variável AF, houve aumento exponencial conforme o avanço da época de avaliação (Fig. 22). O comportamento entre os biótipos foi similar, considerando o coeficiente exponencial das equações, sendo que o biótipo suscetível, comparativamente ao resistente, apresentou maior AF de plantas somente no final do período de avaliação. A AF é importante para a interceptação da luz, no entanto, a eficiência depende da área fotossinteticamente ativa.

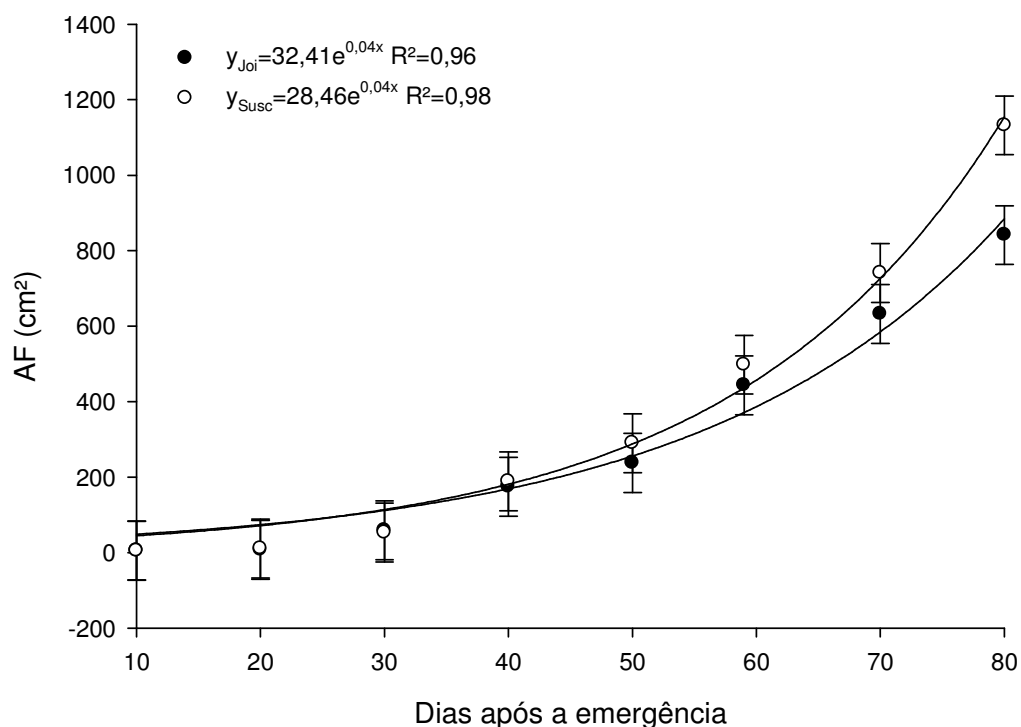


Figura 22 - Área foliar (AF) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.

Em relação ao acúmulo MMSPA o comportamento entre os biótipos foi semelhante, diferindo apenas aos 70 e 80 DAE, com maior acúmulo para o biótipo resistente (Fig. 23). Em biótipos de azevém suscetível ao herbicida glifosato houve maior produção de MMSPA comparado ao resistente (VARGAS et al., 2005). O acúmulo de MMSPA é o resultado desempenho do sistema assimilatório, sendo que 90% da MMSPA produzida pela planta ao longo do seu crescimento resulta da atividade fotossintética (BENINCASA, 2003). Indivíduos com maior acúmulo de massa da matéria seca em menor espaço de tempo demonstram maior habilidade competitiva, quando em competição (CARVALHO et al., 2005; RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007).

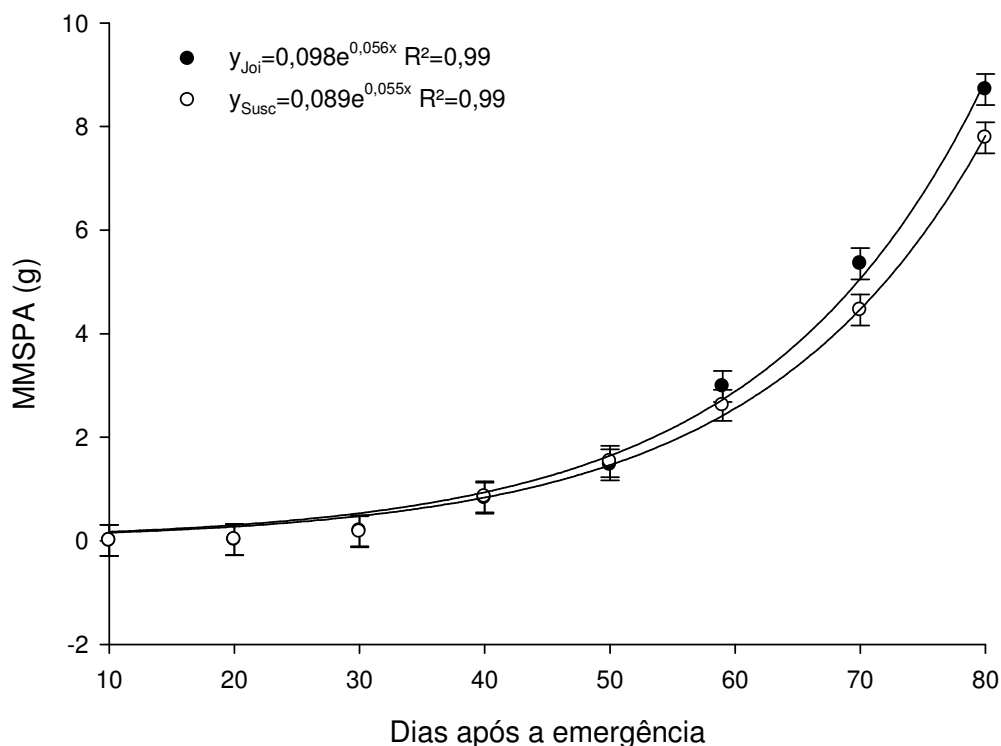


Figura 23 - Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.

Para a variável TCA a relação entre os biótipos foi similar, considerando o coeficiente exponencial das equações (Fig. 24). Houve diferença apenas aos 70 DAE com maior velocidade de crescimento para o biótipo Joi. Essa variável pode ser útil para diferenciar a habilidade de competição entre os biótipos, considerando mais competitivo o que possui TCA inicial mais alto, entretanto, não foi observada essa diferença entre os biótipos avaliados no início do desenvolvimento. Biótipos de *Bidens pilosa*, resistentes aos inibidores da ALS, tiveram TCA inicial menor que o biótipo suscetível, porém entre os 28 e 42 dias após a semeadura a TCA foi superior e igualou-se ao suscetível a partir dos 49 dias (CHRISTOFFOLETI, 2001). De acordo com os autores, esses resultados explicam por que o biótipo resistente é mantido em baixa frequência na ausência do herbicida como agente de pressão de seleção.

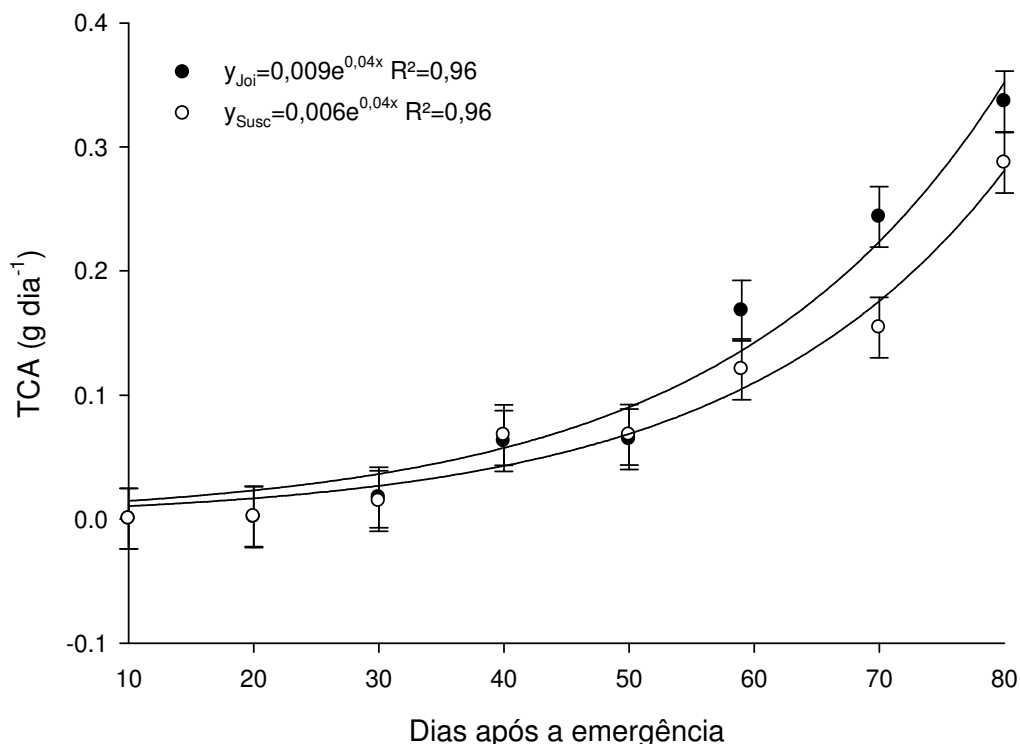


Figura 24 - Taxa de crescimento absoluto (TCA) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.

A TCFR foi semelhante para ambos os biótipos ao longo das avaliações, portanto, os biótipos não se diferenciam na capacidade produtiva diária de matéria por grama de planta (Fig. 25). A TCFR diminuiu para ambos os biótipos, após os 40 DAE, isso porque, inicialmente a AF das plantas é constituída de folhas jovens e à medida que se desenvolvem diminuem a capacidade fotossintética, aumentando as perdas por respiração. Em biótipos de *B. pilosa*, resistentes aos inibidores da enzima ALS, foram observadas diferenças apenas em fase intermediária de crescimento, com superioridade para o biótipo resistente (CHRISTOFFOLETI, 2001).

A variável RAF declinou com o avanço das avaliações (Fig. 26), diferindo apenas aos 20 DAE, com menor RAF para o biótipo Joi. Este resultado decorre do autossombreamento, o que acarreta diminuição da área útil para a fotossíntese, além do surgimento dos órgãos reprodutivos funcionando como drenos (BENINCASA, 2003).

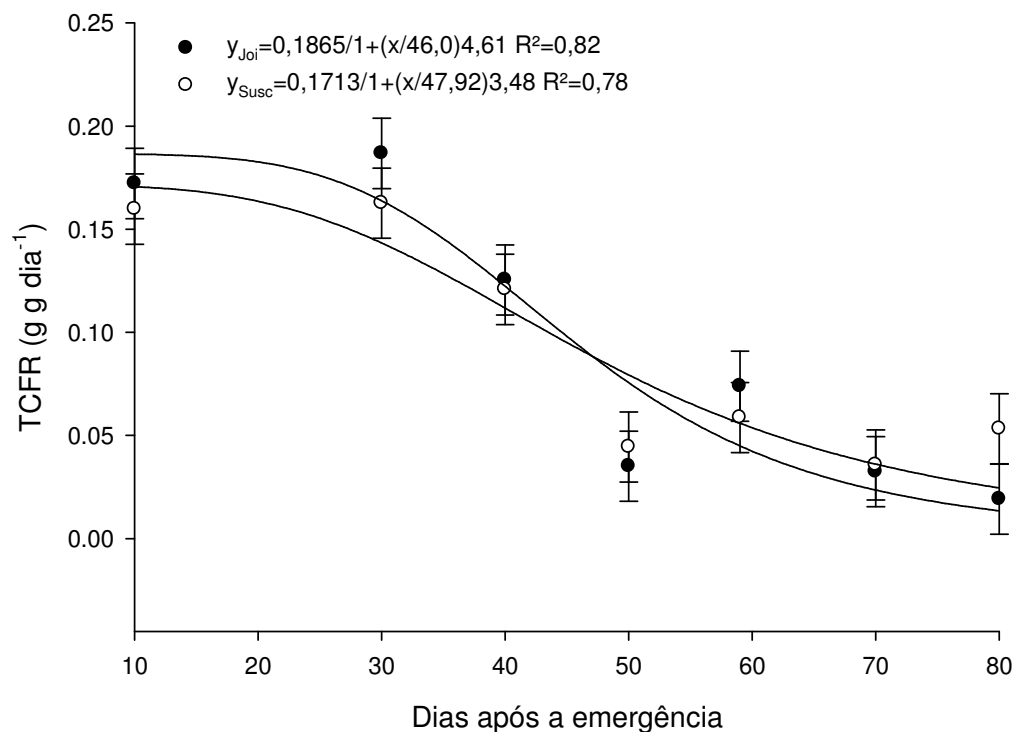


Figura 25 - Taxa de crescimento foliar relativo (TCFR) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.

Para a variável TAL foi observada diferença, na média das avaliações, entre os biótipos, com maior eficiência fotossintética para o biótipo Joi (Fig. 27). Em contrapartida para biótipos de *B. pilosa*, resistentes aos inibidores da enzima ALS, a eficiência até os 30 dias após a semeadura foi maior para o suscetível (CHRISTOFFOLETI, 2001).

Considerando as variáveis avaliadas, pode-se inferir que os biótipos resistente e suscetível possuem poucas diferenças adaptativas, sendo mais provável essas diferenças terem ocorrido pela diferença de origem dos biótipos. Resultados semelhantes foram observadas entre biótipos resistentes e suscetíveis aos herbicidas inibidores da enzima ALS, quanto às características de desenvolvimento para as espécies de *Bidens subalternans* (LAMEGO; VIDAL; BURGOS, 2011), *Cyperus difformis* (DAL MAGRO, 2011), *Euphorbia heterophylla* (VARGAS; SILVA, 2009), *Bidens*

pilosa (CHRISTOFFOLETI, 2001) e *Raphanus raphanistrum* (LI et al., 2013). Já, para biótipos de *Fimbristylis miliacea* resistente e suscetível a herbicidas inibidores da enzima ALS, houve diferenças quanto aos seus valores adaptativos no início do florescimento, porém não houve diferenças em estádios iniciais de desenvolvimento (SCHAEDLER et al., 2013). A ausência de efeitos negativos no crescimento de plantas com diferentes mutações na enzima ALS contribui para explicar a alta frequência de alelos de resistência na população (PRESTON; POWLES, 2002; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013).

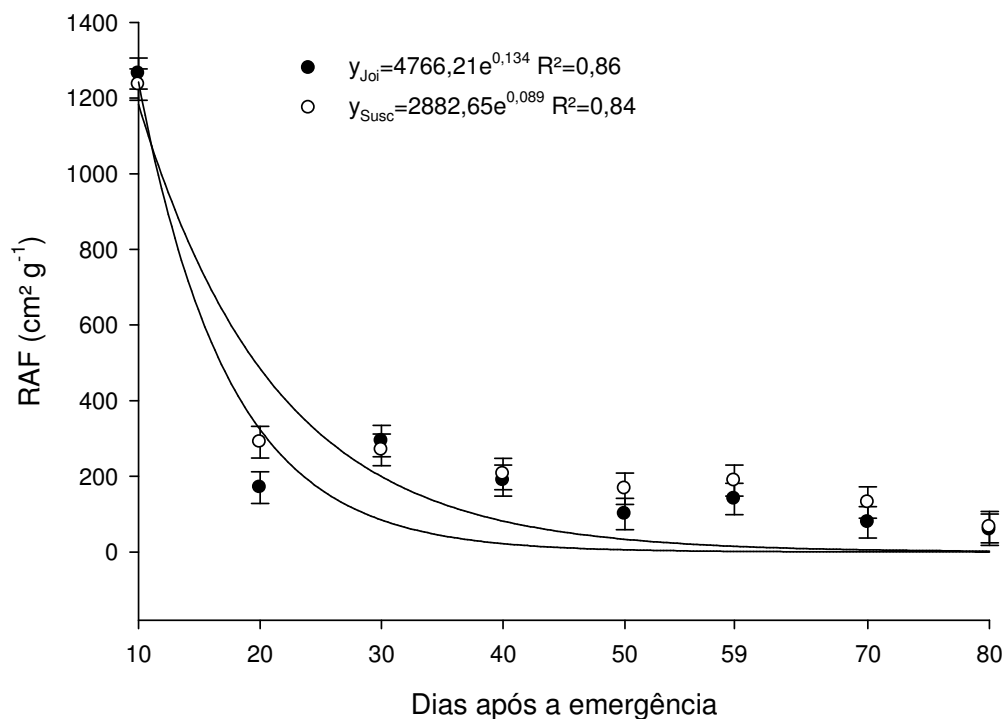


Figura 26 - Razão de área foliar (RAF) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódico, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das repetições entre biótipos e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média.

A modificação causada na enzima ALS, que confere resistência, não está correlacionada a decréscimo de produtividade da planta (CHRISTOFFOLETI, 2001). Portanto, de acordo com os autores, estratégias preventivas de resistência devem ser adotadas, pois, uma vez estabelecida a população resistente, naturalmente ela não retorna para a frequência original de suscetibilidade. Cuidados maiores devem

ser tomados quando as espécies de plantas daninhas possuem polinização cruzada, podendo ocorrer cruzamento entre os biótipos resistentes e suscetíveis, aumentando rapidamente a frequência do biótipo resistente.

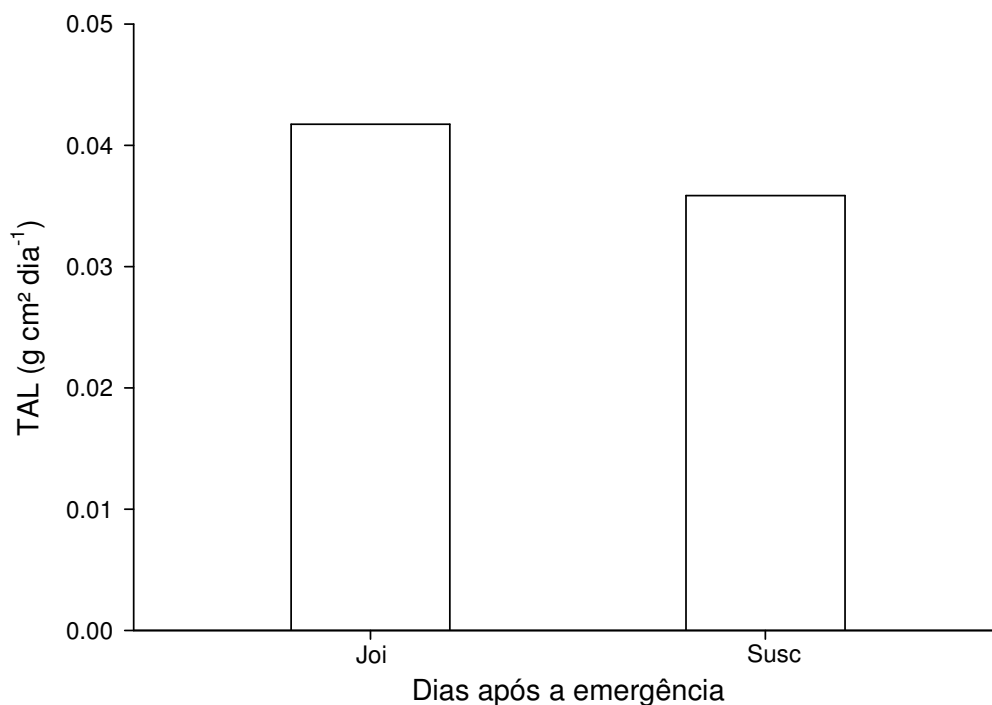


Figura 27 - Taxa assimilatória líquida (TAL) de biótipos de azevém resistente (Joi) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, avaliada dos 10 aos 80 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011.

Em relação ao experimento de habilidade competitiva de biótipos de azevém resistentes e suscetível ao iodosulfurom-metílico, com o trigo, o teste de normalidade demonstrou não ser necessária a transformação dos dados.

Analisando os resultados obtidos para a PR, para as variáveis AF e MMSPA, constatou-se, de forma geral, que a cultura do trigo foi mais competitiva que ambos os biótipos de azevém, sendo as curvas de PR para a cultura com forma convexa e dos biótipos de azevém côncava (Fig. 28 e 29). Em ambos os casos houve benefício para a cultura e prejuízo para a planta daninha, demonstrando que a competição ocorreu pelos mesmos recursos do meio, sendo a cultura a mais eficiente em utilizá-los. Porém, considerando que para haver significância, pelo menos duas proporções

devem apresentar diferenças, os desvios da PR para o biótipo suscetível não foram significativos, para ambas as variáveis, competindo com o trigo (tab. 13). Dessa forma, a habilidade competitiva do azevém suscetível foi equivalente a cultura. Já, a PRT apresentou resultados variados, sendo que não foram observados desvios entre os valores esperados e estimados, para ambas as variáveis, quando na competição entre a cultura e o azevém resistente. Em contrapartida, foram observados desvios da PRT, nas proporções 50:50 e 25:75, para ambas as variáveis, quando na competição entre a cultura e o azevém suscetível.

Foram observados desvios de PR da cultura, para MMSPA nas três proporções, quando competindo com o azevém suscetível comparado com a respectiva reta hipotética (tab. 13). Já quando competindo com o biótipo resistente foram observados desvios de PR da cultura e do biótipo nas proporções 50:50 e 25:75, para ambas as variáveis. Essas variações foram positivas para a cultura e negativa para o azevém, confirmando que a cultura foi mais competitiva.

Para a cultura do trigo, competindo com o azevém suscetível, não houve diferença na AF comparado ao monocultivo, porém, competindo com o biótipo resistente houve incremento na AF nas proporções 50:50 e 25:75 (tab. 14). Em relação a MMSPA do trigo, houve incremento para essa variável em relação ao monocultivo em todas as proporções quando competindo com o biótipo suscetível e na menor proporção da cultura quando em competição com o resistente. Ao analisar as diferenças para ambas as variáveis AF e MMSPA, entre as misturas, não houve diferença para a cultura ao competir com o biótipo suscetível, no entanto, houve incremento, em geral, quando a cultura participava com igual ou menor proporção de plantas na mistura com o resistente. Portanto, em 50% das comparações houve diferença para a cultura competindo com ambos os biótipos, com incremento de MMSPA e AF, sendo que nesses casos, a cultura prefere competir com a planta daninha em relação à competição intraespecífica. No entanto, em 50% das comparações não foram observadas diferenças significativas. Em trabalhos com a cultura do arroz em competição com *Cyperus difformis* (DAL MAGRO et al., 2011) e em trigo competindo com azevém (RIGOLI et al., 2008), foram observadas maior habilidade competitiva da cultura em relação a espécie daninha.

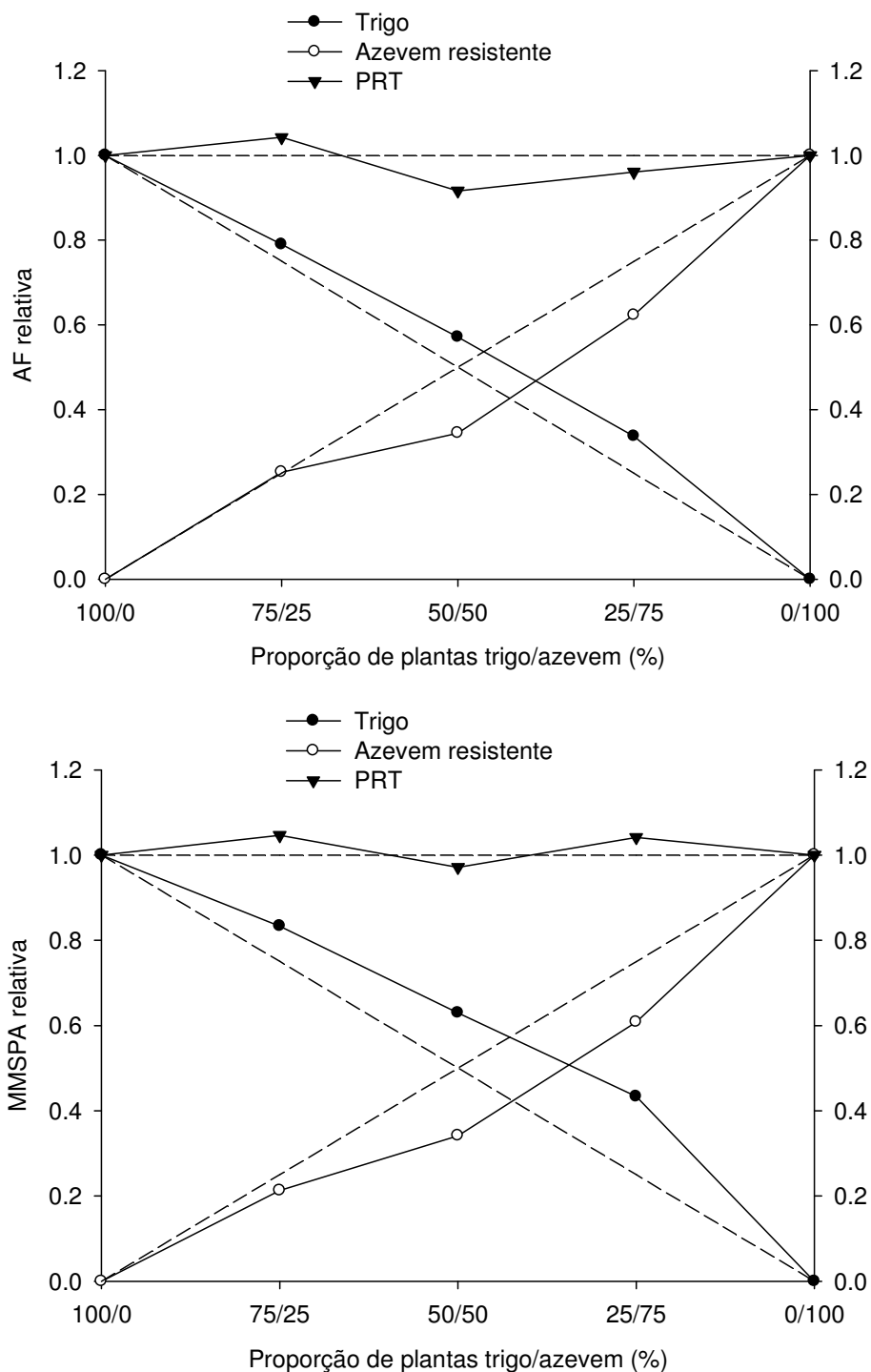


Figura 28 - Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de avevem, resistente ao iodosulfurom-metílico sódio, e trigo, FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Círculos vazios (○) representam a PR do biótipo resistente, círculos cheios (●) a PR do trigo e triângulos (▼) indicam a PRT. Linhas tracejadas referem-se às produtividades relativas hipotéticas, quando não ocorre interferência de uma espécie sobre a outra.

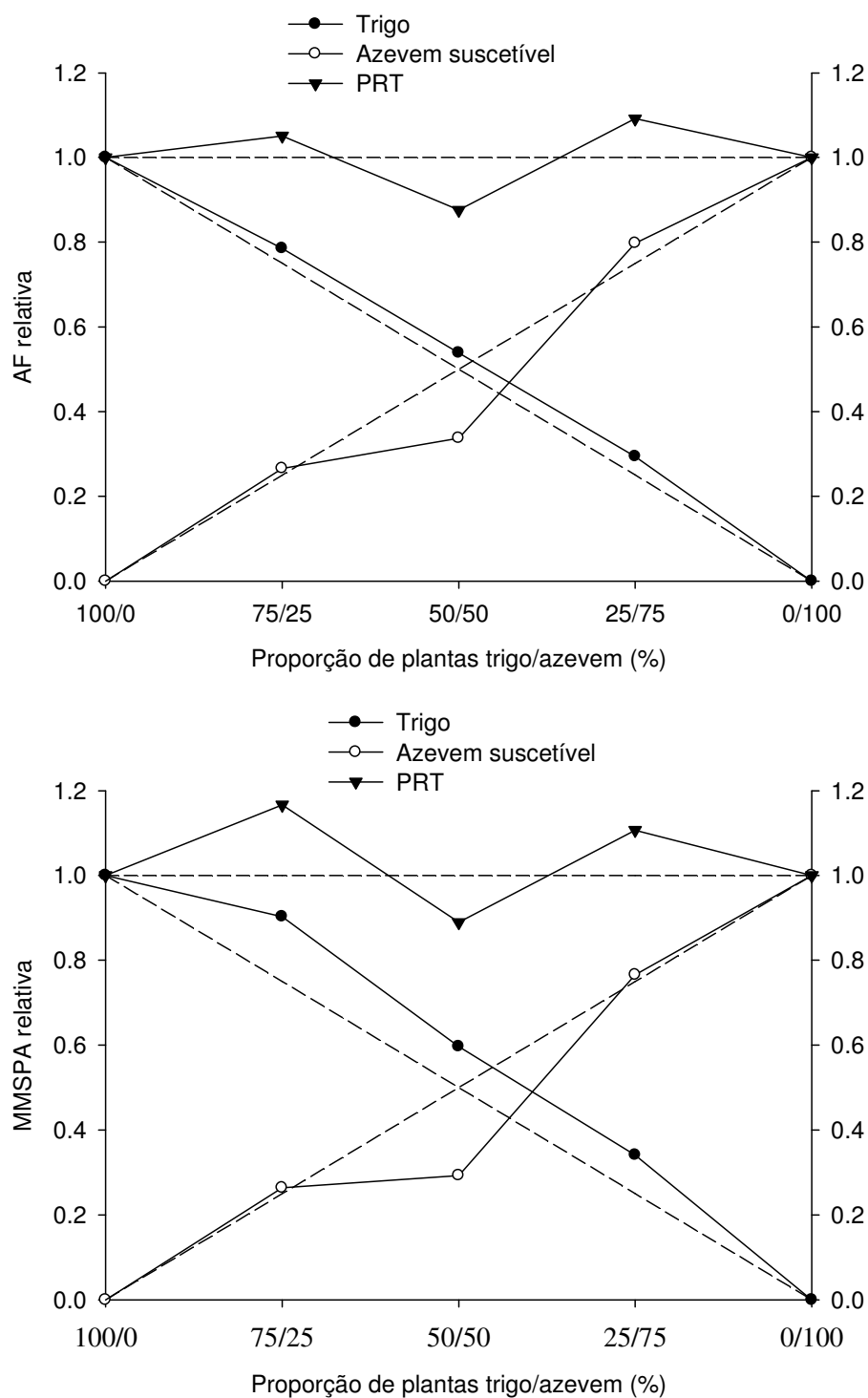


Figura 29 - Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de avevem suscetível ao iodosulfurom-metílico sódio e trigo, FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. Círculos vazios (○) representam a PR do biótipo suscetível, círculos cheios (●) a PR do trigo e triângulos (▼) indicam a PRT. Linhas tracejadas referem-se às produtividades relativas hipotéticas, quando não ocorre interferência de uma espécie sobre a outra.

Tabela 11 - Diferenças relativas de produtividade para as variáveis área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e produtividade relativa total (PRT), nas proporções de plantas 75:25, 50:50 e 25:75 de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao iodosulfurom-metílico sódio, competindo com trigo cultivar FUNDACEP Horizonte. UFPel, Capão do Leão-RS, 2011

	Proporção de plantas associadas		
	75:25	50:50	25:75
AF (cm ² planta ⁻¹)			
PRa (trigo)	0,04 (± 0,02) ^{ns}	0,07 (± 0,00)*	0,09 (± 0,01)*
PRb (resistente)	0,00 (± 0,00) ^{ns}	-0,16 (± 0,01)*	-0,13 (± 0,02)*
PRT	1,05 (± 0,02) ^{ns}	0,92 (± 0,01)*	0,96 (± 0,03) ^{ns}
PRa (trigo)	0,04 (± 0,06) ^{ns}	0,04 (± 0,03) ^{ns}	0,04 (± 0,01)*
PRb (suscetível)	0,02 (± 0,02) ^{ns}	-0,16 (± 0,01)*	0,05 (± 0,03) ^{ns}
PRT	1,05 (± 0,05) ^{ns}	0,88 (± 0,03)*	1,09 (± 0,02)*
MMSPA (g planta ⁻¹)			
PRa (trigo)	0,08 (± 0,03) ^{ns}	0,13 (± 0,02)*	0,18 (± 0,06)*
PRb (resistente)	-0,04 (± 0,02) ^{ns}	-0,16 (± 0,02)*	-0,14 (± 0,02)*
PRT	1,05 (± 0,02) ^{ns}	0,97 (± 0,02) ^{ns}	1,04 (± 0,08)*
PRa (trigo)	0,15 (± 0,05)*	0,10 (± 0,02)*	0,09 (± 0,01)*
PRb (suscetível)	0,01 (± 0,02) ^{ns}	-0,21 (± 0,01)*	0,02 (± 0,03) ^{ns}
PRT	1,17 (± 0,05) ^{ns}	0,89 (± 0,03)*	1,11 (± 0,04)*

* Diferença significativa pelo teste "t" (p < 0,05). Valores entre parênteses representam o erro-padrão da média.

Para a maioria das comparações do biótipo suscetível competindo com a cultura, não houve diferença em relação ao monocultivo, ou seja, o tipo de competição é indiferente (tab. 14). Já o resistente competindo com a cultura diminuiu a MMSPA e AF na maioria das comparações em relação ao monocultivo, sendo, portanto, a competição interespecífica desvantajosa. Com relação as misturas, ambos os biótipos diminuíram a AF e MMSPA quando competindo com igual proporção à cultura, com exceção do biótipo resistente para essa última variável.

Em trabalho com biótipos de azevém resistente e suscetível ao glifosato, em diferentes populações dos biótipos, competindo com a cultura do trigo, o biótipo suscetível possui maior capacidade competitiva que o resistente (FERREIRA et al., 2008). Com aumento na população de azevém, a redução das porcentagens de perfilho, de massa seca foliar, de massa seca da parte aérea, de área foliar e de estatura das plantas de trigo, foi menor quando este competiu com o azevém resistente (FERREIRA et al., 2008). Em condições normais, em alta população e isento da aplicação de glifosato, o biótipo suscetível é mais competitivo que o resistente, dominante na população (FERREIRA et al., 2006).

Tabela 12 - Resposta de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, competindo com trigo cultivar FUNDACEP Horizonte. UFPel, Capão do Leão-RS, 2011

Proporção de plantas					
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
Biótipo	AF (cm ² planta ⁻¹)				
Trigo	26,20	c 27,61 ^{ns}	b 29,95 [*]	a 35,38 [*]	-
Resistente	-	a 52,41 ^{ns}	c 35,76 [*]	b 43,07 [*]	51,85
Trigo	26,20	a 27,43 ^{ns}	a 28,42 ^{ns}	a 30,85 ^{ns}	-
Suscetível	-	a 55,28 ^{ns}	b 35,07 [*]	a 53,08 ^{ns}	52,00
	MMSPA (g planta ⁻¹)				
Trigo	0,34	b 0,37 ^{ns}	ab 0,42 ^{ns}	a 0,57 [*]	-
Resistente	-	a 0,37 [*]	a 0,30 [*]	a 0,36 [*]	0,44
Trigo	0,34	a 0,40 [*]	a 0,40 [*]	a 0,45 [*]	-
Suscetível	-	a 0,38 ^{ns}	b 0,21 [*]	a 0,37 ^{ns}	0,37

Médias seguidas na linha por ^{ns} e ^{*} indicam diferença não significativa e significativa, respectivamente pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) em relação a testemunha (T). ⁽²⁾ Médias antecedidas por mesma letra minúscula na linha, em proporções com mistura de plantas, não diferem entre si pelo Duncan ($p \leq 0,05$).

Os índices CR, K e C indicam qual espécie se manifesta mais competitiva, e sua interpretação conjunta indica com maior segurança a competitividade das espécies (COUSENS, 1991). Observou-se que para ambas as variáveis o trigo foi o mais competitivo em relação aos biótipos de azevém, e o biótipo suscetível, mais competitivo que o resistente (tab. 15). Esses resultados corroboram em parte com os observados para a competição de trigo com azevém suscetível e com resistência de baixo nível ao fluazifop, em que o trigo apresentou habilidade competitiva superior apenas ao biótipo com resistência de baixo nível e, quando os biótipos competiram entre si a habilidade competitiva foi equivalente (FRAGA, 2013). Em outro trabalho, a habilidade competitiva do trigo também foi superior ao azevém, porém, inferior ao nabo em proporções iguais, sendo que ambas as plantas daninhas ocupam o mesmo nicho ecológico do trigo (RIGOLI et al., 2008).

Não foram observadas diferenças na capacidade competitiva para biótipos resistentes aos inibidores da enzima ALS em *Amaranthus retroflexus* L., em condições de campo (SIBONY; RUBIN, 2003), em casa de vegetação para *Bidens subalternans* DC. (LAMEGO; VIDAL; BURGOS, 2011), em *Solanum ptychanthum* (ASHIGH; TARDIF, 2009), e *Kochia scoparia* (LÉGÈRE et al., 2013). A falta de efeitos negativos em biótipos resistentes aos inibidores da enzima ALS favorece a evolução, propagação e competitividade dessas espécies nos sistemas agrícolas (LÉGÈRE et al., 2013).

Tabela 13 - Índices de competitividade entre o trigo e o azevém suscetível e trigo e azevém resistente, expressos por competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamentos relativos (K) e de competitividade (C) aos 60 DAE (dias após a emergência). FAEM/UFPeL, Capão do Leão, 2011.

Trigo x azevém resistente				
	CR	K _t (trigo)	K _r (azevém)	C
MMSPA	1,87 (± 0,14)*	1,72 (± 0,13)*	0,52 (± 0,04)	0,29 (± 0,03)*
AF	1,66 (± 0,06)*	1,33 (± 0,01)*	0,52 (± 0,02)	0,23 (± 0,01)*
Trigo x azevém suscetível				
	CR	K _t (trigo)	K _s (azevém)	C
MMSPA	2,04 (± 0,09)*	1,50 (± 0,15)*	0,41 (± 0,02)	0,30 (± 0,02)*
AF	1,60 (± 0,06) ^{ns}	1,18 (± 0,11)*	0,51 (± 0,02)	0,20 (± 0,02)*

* Diferença significativa pelo teste "t" (p<0,05). Valores entre parênteses representam o erro-padrão da média. K_t, K_s e K_r são os coeficientes de agrupamentos relativos do trigo com o azevém suscetível e resistente, respectivamente.

Alguns trabalhos demonstram haver efeitos pleiotrópicos, como em *Lactuca serriola*, onde a substituição Pro-197 na enzima ALS, causou custo evidente com 15% redução da massa da matéria vegetal do resistente em comparação com indivíduos sensíveis crescendo em condições competitivas em iguais proporções (ALCOCER-RUTHLING; THILL; SHAFII, 1992). Efeitos negativos na morfologia e anatomia vegetal também tem sido descritos para *Amaranthus powellii* resistente a enzima ALS com mutação Trp-574-Leu (TARDIF; RAJCAN; COSTEA, 2006). Para biótipos de *Solanum ptychanthum*, resistente aos inibidores da enzima ALS ocorre custo devido à mutação em condições ótimas de crescimento, porém possuem maior germinação e crescimento vegetativo que biótipos suscetíveis em temperaturas baixas (ASHIGH; TARDIF, 2011). Isso evidencia que o custo também depende das condições ambientais em que as plantas são submetidas.

No entanto, para chegar a conclusões seguras quanto ao custo de adaptação de biótipos, é necessário trabalhar com biótipos oriundos de diferentes regiões geográficas, com a mesma alteração na enzima e com seus respectivos controles locais (biótipo suscetível) (LÉGÈRE et al., 2013), ou seja, múltiplas populações (COUSENS; GILL; SPEIJERS, 1997). Portanto, faz-se necessário realizar novos estudos com maior número de biótipos, com controle genético e caracterização molecular para assegurar-se dos resultados.

Quanto à maior habilidade do trigo em competir com o azevém, esse resultado não pode ser tomado como base para inferir que não há prejuízo para a

cultura, já que o experimento foi conduzido até os 60 DAE, além do mais, em condições de campo são diferentes e a população de plantas daninhas é variável.

5.4 Conclusões

O valor adaptativo entre biótipos de azevém resistente ou suscetível ao iodosulfurom-metílico sódio, em geral, é similar.

A cultura do trigo apresenta maior habilidade competitiva em relação aos biótipos de azevém resistente ou suscetível ao iodosulfurom-metílico.

Para o biótipo de azevém resistente a competição interespecífica é prejudicial.

6 CAPÍTULO V - Herança da resistência de azevém ao iodosulfurometílico sódio

6.1 Introdução

Os herbicidas inibidores da enzima ALS foram lançados no mercado em 1982, e atualmente representam grande parte do mercado, com aproximadamente 56 diferentes moléculas distribuídas em 5 grupos químicos (HEAP, 2014; SAARI; COTTERMAN; THILL, 1994; SENSEMAN, 2007). Esses herbicidas atuam bloqueando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima ALS, impedindo a síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008). Apesar dos herbicidas serem efetivos no controle de plantas daninhas, a utilização de um único herbicida ou mesmo grupo com o mesmo mecanismo de ação, tem resultado na seleção de espécies resistentes (TRANEL; WHRIGHT, 2002). Como é o caso do azevém resistente aos inibidores da enzima ALS, selecionado, principalmente, pelo uso contínuo do herbicida iodosulfurom em culturas anuais como o trigo. No Brasil, o primeiro registro da espécie resistente foi realizado no ano de 2010, no estado do Rio Grande do Sul (HEAP, 2014).

O azevém é considerado uma das mais problemáticas plantas daninhas em cereais de inverno em todo o mundo. A espécie germina antes da implantação e durante o crescimento das culturas de inverno, afetando negativamente os componentes de produtividade da cultura do trigo pela competição pelo nitrogênio (PAULA et al., 2011), interferindo no afilhamento da cultura e reduzindo a qualidade do produto colhido. Dissemina-se facilmente por sementes e a polinização da espécie é cruzada, realizada principalmente pelo vento.

A rápida evolução da resistência de espécies aos herbicidas, e sobretudo aos inibidores da enzima ALS, que representam o maior número de casos

registrados, é influenciada por vários fatores. Entre eles, os ligados a genética, como a frequência inicial de genes resistentes, números de genes envolvidos com a resistência, dominância do gene e custo de adaptação dos genes de resistência (POWLES; YU, 2010). Outros fatores como alta eficiência dos herbicidas para os biótipos sensíveis e atividade residual no solo contribuem para o aumento de casos de resistência (TRANEL; WRIGHT, 2002). Em populações de *L. rigidum* a alta frequência inicial de indivíduos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS (2.2×10^{-5} à 1.2×10^{-4}), que nunca antes foram expostos a esses herbicidas, também ajuda a explicar a rápida evolução da resistência (PRESTON; POWLES, 2002).

Estudos de herança em espécies resistentes aos inibidores da enzima ALS tem mostrado que a resistência é controlada por um único gene nuclear com incompleta (BOUTSALIS; POWLES, 1995) ou completa dominância (WANG et al., 2003), como também foi encontrada a resistência controlada por um único gene semidominante (BRUNIARD; MILLER, 2001). Em outro estudo com *Monochoria vaginalis* os resultados sugerem que a resistência é controlada por um único gene nuclear com resistência dominante em baixas doses e suscetibilidade dominante em altas doses (IMAIZUMI; WANG; TOMINAGA, 2008). O grau de dominância pode estar relacionado com o genótipo, como exemplo, em espécies diplóides os alelos de resistência aos inibidores da ALS são dominantes sobre espécies suscetíveis em doses de campo recomendadas e os heterozigotos sobrevivem a dose normal de campo, facilitando a rápida disseminação dos alelos de resistência (YU; POWLES, 2014).

Os estudos de herança geram importantes entendimentos sobre a evolução da resistência, estrutura genética de uma população, dinâmica da adaptação e manejo da resistência (NEVE; VILA-AIUB; ROUX, 2009). Com o aumento nos casos de azevém resistentes aos inibidores da enzima ALS, a caracterização da resistência, quanto ao número de genes e tipo de herança, é fundamental para que técnicas de manejo sejam recomendadas e utilizadas no sentido de evitar e/ou retardar o aparecimento e a multiplicação das plantas resistentes (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001). Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar o tipo de herança, número de genes envolvidos e o grau de resistência dos biótipos de azevém, homozigotos e heterozigotos, resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio.

6.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel e Embrapa Trigo/Passo Fundo, nos anos de 2011, 2012 e 2013. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado.

Os biótipos utilizados foram oriundos das cidades de Jóia (resistente), localizado a latitude de 28° 38' 51" e longitude de 54° 07' 21", e o suscetível de Pelotas, em latitude 31° 48' 04" e longitude 52° 24' 50", selecionados conforme descrito no capítulo 1. Após a produção de sementes estas foram semeadas para comprovar que os biótipos são homozigotas resistentes e suscetíveis ao herbicida. Foram semeadas 10 sementes de cada genitor em bandeja e quando as plantas atingiram 3-4 folhas foi realizada a aplicação de iodosulfurom-metílico sódico nas dose de 7 g i.a ha⁻¹. Os genitores que tiveram as plantas sobreviventes foram consideradas em homozigose para a resistência e aqueles que todas as plantas morreram foram consideradas homozigotas suscetíveis. Foram selecionados seis genitores homozigotos resistentes e seis homozigotos suscetíveis ao iodosulfurom. Para realizar os cruzamentos, selecionou-se seis genitores homozigotos resistentes e seis genitores homozigotos suscetíveis e foram constituídos seis pares (R x S).

Sementes de cada genitor foram semeadas em vasos com capacidade para 5L. Após a emergência das plantas, foi procedido desbaste, deixando-se uma planta por vaso. Um vaso contendo o genitor resistente e um vaso contendo o genitor suscetível foram colocados em estufas individualizadas e vedadas para evitar contaminações com pólen externo. Dessa forma, foi aceito que os genitores foram polinizados somente com polén oriundo de seu par obtendo-se a F₁. Sementes F₁ foram semeadas em vasos e as plantas originadas destas sementes foram cruzadas para obtenção da F₂. Por fim, foram selecionados três pares de genitores e realizados retrocruzamentos entre plantas F₁ e os respectivos genitores masculinos e femininos resistentes (RCr) e sensíveis (RCs).

As sementes F₁, F₂, RCr e RCs e dos genitores foram semeadas em bandejas com capacidade para 5 kg de solo e avaliadas, por meio da aplicação do herbicida iodosulfurom (5 g i.a. ha⁻¹), quanto à sua suscetibilidade ou resistência. As frequências das classes obtidas foram testadas pelo teste de qui-quadrado. Além

disso, foram semeadas, em bandejas, sementes F_1 e dos genitores resistente e suscetível. As plantas originadas destas sementes, foram tratadas com doses crescentes de iodosulfurom (0, 0,88, 1,75, 3,5 e 7 g i.a. ha^{-1}), sendo a dose 3,5 g i.a ha^{-1} registrada para o controle do azevém. Foram avaliados o controle visual e a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA). O controle foi avaliado aos 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), adotando-se a escala percentual, onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte de plantas, respectivamente. A MMSPA foi determinada após avaliação do controle pela secagem do material vegetal em estufa a temperatura de 60°C até atingir massa constante. Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Quando significativo as doses foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.3 Resultados e Discussão

O número total de plantas, número de plantas resistentes e sensíveis, frequências observadas e esperadas, bem como os valores do teste χ^2 e as respectivas probabilidades estão contidas na tab. 14. Para todas as frequências foram aceitas as hipóteses de igualdade entre os números observados e esperados, com 95% de probabilidade, ou seja, os desvios obtidos não foram significativos. Os genitores resistente (R) e suscetível (S) confirmaram, respectivamente, sua resistência e sensibilidade ao herbicida.

No primeiro cruzamento simples suscetível x resistente (S x R), o F_1 apresentou-se totalmente resistente evidenciando que o genitor masculino transmitiu a característica de resistência para a prole. A geração F_2 apresentou segregação resistente/suscetível 2,2:1 com teste qui-quadrado fornecendo probabilidade de 21,43% desta ser 3:1. O retrocruzamento resistente (RCr) apresentou probabilidade de 82,3% de ser 1:1, sendo que a segregação apresentou 1 planta suscetível das 20 testadas. O retrocruzamento suscetível (RCs) apresentou segregação resistente/suscetível 1,2:1, quando o esperado era 1:1, com probabilidade de 67,06% de ser 1:1.

Tabela 14 - Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de azevém suscetíveis e resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2013.

Cruzamento	Número de plantas	Resistente	Suscetível	Frequência		χ^2	Probabilidade (%)
				Esperada	Observada		
Suscetível	6	-	6	-	-	-	-
Resistente	6	6	-	-	-	-	-
SxR							
F1	68	68	0	1:0	1:0	0,000	100,00
F2	70	48	22	3:1	2,2:1	1,542	21,43
RCr	20	19	1	1:0	19:0	0,050	82,30
RCs	22	12	10	1:1	1,2:0	0,181	67,06
RxS							
F1	45	45	0	1:0	1:0	0,000	100,00
F2	81	59	22	3:1	2,7:1	0,201	65,39
RCr	56	50	6	1:0	8,3:0	0,642	42,30
RCs	19	12	7	1:1	1,7:1	1,310	25,24

No segundo cruzamento simples, agora resistente x suscetível (R x S), a geração F₁, como no primeiro cruzamento, mostrou-se totalmente resistente, indicando que a resistência também é transmitida hereditariamente pela planta mãe e, novamente, que a resistência é uma característica dominante. A F₂ apresentou segregação resistente/suscetível 2,7:1, com probabilidade de 65,39% ser 3:1. Na segregação do RCr foram testadas 56 plantas e destas 50 foram resistentes, sendo que a segregação esperada era de 1:0 resistente/suscetível, com probabilidade de 42,3% ser a esperada. No RCs a segregação observada foi de 1,7:1 e a esperada era 1:1, com probabilidade de 25,24% ser a esperada.

A geração F₁, em ambos os cruzamentos, mostrou-se totalmente resistentes ao herbicida, evidenciando que a resistência é uma característica dominante transmitida hereditariamente tanto pelo pai quanto pela mãe, ou seja, a resistência é transmitida por genes nucleares. Estes resultados são confirmados pelos retrocruzamentos. A F₂ apresentou tendência para o padrão de segregação 3:1, indicando que a resistência é codificada por gene dominante. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para diferentes espécies de plantas aos herbicidas inibidores da ALS (BOUTSALIS; POWLES, 1995; VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001; VAN EERD et al., 2004)

Houve efeito significativo da interação entre biótipos (suscetível, heterozigoto e resistente) e doses do herbicida para todas as variáveis avaliadas ($p < 0,05$) (tab. 15). Os resultados quanto ao teste de dominância das plantas F₁,

evidenciam que as plantas, homozigotas resistentes e as heterozigotas, apresentam grau de resistência semelhante, pois até a máxima dose (7 g i.a ha⁻¹) não são controladas pelo herbicida. Já as plantas suscetíveis diminuem significativamente a MMSPA a partir da menor dose do herbicida (0,88 g i.a ha⁻¹) e a partir da dose de registro (3,5 g i.a ha⁻¹), apresentam controle acima de 60%.

Tabela 15 - Avaliação do controle e MMSPA, em porcentagem, em função da aplicação de doses crescentes do herbicida iodosulfurom-metílico sódio em biótipos de azevém suscetível, heterozigoto (F1) e resistente, em casa-de-vegetação, Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2013.

Iodosulfurom (g i.a ha ⁻¹)	Suscetível	Heterozigoto	Resistente
Controle (%) 14 DAT			
0,0	0 c ^{ns}	0 c	0 b
0,88	25 b A	10 bc B	14 ab AB
1,75	20 b ^{ns}	22 ab	19 a
3,50	25 ab ^{ns}	22 ab	12 ab
7,00	35 a ^{ns}	27 a	23 a
Controle (%) 21 DAT			
0	0 c ^{ns}	0 b	0 b
0,88	30 b A	18 a AB	10 ab B
1,75	40 ab A	26 a AB	16 ab B
3,50	45 ab A	30 a AB	17 ab B
7,00	48 a A	33 a AB	24 a B
Controle (%) 28 DAT			
0	0 c ^{ns}	0 b	0 ^{ns}
0,88	20 c ^{ns}	18 ab	5
1,75	48 b A	20 ab B	5 B
3,50	62 ab A	20 ab B	8 B
7,00	80 a A	32 a B	19 B
MMSPA (%)			
0	100 a ^{ns}	100 a	100 a
0,88	35 b B	83 abc A	87 ab A
1,75	21 b B	90 ab A	83 ab A
3,50	20 b B	52 c AB	77 ab A
7,00	17 b B	60 bc A	62 b A

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. DAT: dias após a aplicação do herbicida. MMSPA: massa da matéria seca da parte aérea.

Aos 14 DAT os biótipos diferiram apenas na dose 0,88 g i.a ha⁻¹ do herbicida, com maior controle para o biótipo suscetível e menor para o heterozigoto (tab. 15). Aos 21 DAT, observou-se diferença entre biótipos para todas as doses, sendo maior controle para o biótipo suscetível, menor para o resistente e,

intermediário para o heterozigoto. Porém, aos 28 DAT, o controle e a redução da MMSPA foram maiores para o biótipo suscetível, e não diferiram entre o resistente e o heterozigoto, comprovando a dominância para resistência das plantas F1.

Esperava-se controle maior para o biótipo suscetível, no entanto, era necessário maior tempo de avaliação, sendo evidente que a partir da dose de registro o biótipo chegaria ao controle próximo de 100%. Dessa forma, evidencia-se que a resistência apresentada pelos biótipos de azevém é codificada por um gene nuclear com dominância completa. As características com herança do tipo nuclear têm disseminação rápida na população, via pólen, em espécies com alta taxa de fecundação cruzada, como é o caso do azevém.

A resistência dos genótipos heterozigotos tem implicações práticas importantes em lavouras infestadas com essas plantas, pois o aumento da dose de iodosulfurom, não resultará em controle e somente os biótipos suscetíveis serão controlados, selecionando a população dos genótipos resistentes e heterozigotos na área. De acordo com Tranel e Whright (2002), quando o mecanismo de resistência envolvido ocorre pela mutação na enzima alvo, a resistência é, pelo menos, parcialmente dominante, com gene de herança nuclear, transmitido por ambos, sementes e pólen. Além disso, na maioria dos casos, não são observados custos para o gene de resistência na ausência do herbicida, auxiliando na compreensão do porquê da rápida evolução das populações resistentes a esses herbicidas.

6.4 Conclusão

Conclui-se que a resistência do azevém ao herbicida iodosulfurom é codificada por gene dominante nuclear, e que o biótipo heterozigoto não é controlado com a dose de registro do herbicida iodosulfurom.

7 CONCLUSÕES

Os biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) ao iodosulfurom-metílico são controlados com doses entre 8-10 vezes maior que o suscetível e a redução de 50% da matéria seca dos biótipos resistentes ocorrem com doses entre 6-8 vezes maior comparado ao suscetível.

O mecanismo de resistência para os biótipos Col e Joi não envolve a metabolização mediada pelas isoenzimas P450.

Os biótipos de azevém apresentam resistência cruzada para as sulfonilureias e imidazolinonas.

Os herbicidas glifosato e cletodim são alternativas em pós emergência para o controle do biótipo Col resistente ao iodosulfurom-metílico e apenas o herbicida cletodim para o biótipo Joi.

Todos os herbicidas pré-emergentes avaliados são opção para o controle dos biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) aos inibidores da ALS.

O K_m e V_{max} para os biótipos resistentes AR, NC são semelhantes ao suscetível

A resistência dos biótipos NC e AR decorrem da insensibilidade da enzima ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio.

Os biótipos resistentes AR e NC apresentam pouca sensibilidade à inibição por retroalimentação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

Os biótipos resistentes AR e NC metabolizam mais rapidamente o herbicida comparado com o suscetível e não possuem mecanismo de resistência relacionado a velocidade de absorção do herbicida.

O valor adaptativo entre biótipos de azevém resistente ou suscetível ao iodosulfurom-metílico sódio, em geral, é similar.

A cultura do trigo apresenta maior habilidade competitiva em relação aos biótipos de azevém resistente ou suscetível ao iodosulfurom-metílico.

Para o biótipo de azevém resistente a competição interespecífica é prejudicial.

A resistência do biótipo Joi ao herbicida iodosulfurom é codificada por gene dominante nuclear, e o heterozigoto não é controlado com a dose de registro do herbicida iodosulfurom.

8 REFERÊNCIAS

- 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.
- ALCOCER-RUTHLING, M.; THILL, D.C.; SHAFII, B. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, v. 6, n. 6, p. 303–309, 1992.
- ASHIGH, J.; TARDIF, F. An Ala205Val 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.
- ASHIGH, J.; TARDIF, F.J. An amino acid substitution at position 205 of acetohydroxyacid synthase reduces fitness under optimal light in resistant populations of *Solanum ptychanthum*. **Weed Research**, v. 49, n. 5, p. 479–489, 2009.
- ASHIGH, J.; TARDIF, F.J. Water and temperature stress impact fitness of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicide-resistant populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*). **Weed Science**, v. 59, n. 3, p. 341–348, 2011.
- BECKIE, H.J.; REBOUD, X. Selecting for Weed Resistance: Herbicide Rotation and Mixture. **Weed Technology**, v. 23, n. 3, p. 363–370, 2009.
- BECKIE, H. J.; WARWICK, S.I.; SAUDER, C.A.; KELLN, G.M.; LOZINSKI, C. Acetolactate Synthase Inhibitor–Resistant False Cleavers (*Galium spurium*) in Western Canada. **Weed Technology**, v. 26, n. 1, p. 151–155, 2012.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: Funep, 2003. 41p.
- BIANCHI, M.A.; FLECK, N.G.; LAMEGO, F.P. Proporção entre plantas de soja e plantas competidoras e as relações de interferência mútua. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1380–1387, 2006.
- BOUTSALIS, P.; POWLES, S.B. Inheritance and mechanism of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Sonchus oleraceus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 242–247, 1995.

BRUNIARD, J.M.; MILLER, J.F. Inheritance of imidazolinone- herbicide resistance in sunflower. **Helia**, v. 24, n. s/n, p. 11–16, 2001.

CARVALHO, S.J.P. de; MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; OVEJERO, R.F.L.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D. Crescimento e desenvolvimento da planta daninha capim-camalote. **Bragantia**, v.64, n. 4, p.591-600, 2005.

CHIPMAN, D.; BARAK, Z.; SCHLOSS, J.V. "Biosynthesis of 2-Aceto-2-Hydroxy Acid; Acetolactate Synthases and Acetohydroxyacid Synthases," **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1385, n. 2, p. 401-419, 1998.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Análise comparativa do crescimento de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.19, n.1, p.75-83, 2001.

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

CHRISTOFFOLETI, P. J.; WESTRA, P.; MOORE, F. Growth analyses of sulfonylurea resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, v.45, n.5, p.691-695, 1997.

CHRISTOPHER, J.T.; PRESTON, C.; POWLES, S.B. Malathion antagonizes metabolism-based chlorsulfuron resistance on *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 49, n. 3, p. 172–182, 1994.

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

COBB, A.H.; READE, J.P.H. Herbicide Selectivity and Metabolism. In: **Herbicides and Plant Physiology**. Second Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2010. p.176–199.

COLEMAN, J.O.D.; BLAKE-KLAFF, M.M.A.; DAVIES, T.G.E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, p. 1360-1385, 1997.

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

COTTERMAN, J.C.; SAARI, L.L. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype **SR4/34**. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 43, n. 3, p. 182-192, 1992.

COUSENS, R. Aspects of the design and interpretation of competition (interference) experiments. **Weed Technology**, v. 5, n. 3, p.664-673, 1991.

COUSENS, R.; O'NEILL, M. Density dependence of replacement series experiments. **Oikos**, v.66, n.2, p.347-352, 1993.

COUSENS, R.D.; GILL, G.S.; SPEIJERS, E.J. Comment: number of sample populations required to determine the effects of herbicide resistance on plant growth and fitness. **Weed Research**, v. 37, n. 1, p. 1–4, 1997.

DAL MAGRO, T.; HAEDLER, C.E.; FONTANA, L.C.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Habilidade competitiva entre biótipos de *Cyperus difformis* L. resistente ou suscetível a herbicidas inibidores de ALS e destes com arroz irrigado. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p.294-301, 2011.

DÉLYE, C.; BOUCANSAUD, K.; PERNIN, F.; LE CORRE, V. Variation in the gene encoding acetolactate-synthase Lolium species and proactive detection of mutant, herbicide-resistant alleles. **Weed Research**, v. 49, n. 3, p. 326-336, 2009.

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.

DÉLYE, C.; MENCHARI, Y.; MICHEL, M.; CADET, E.; LE CORRE, V. A new insight into arable weed adaptive evolution: mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. **Annals of Botany**, v. 111, n. 4, p. 681–691, 2013.

DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; CATIZONE, P.; URBANO, J.M.; BARNES, J. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, v.48, n.3, p.257-265, 2008.

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

EBERLEIN, C.V.; GUTTIERI, M.J.; MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; BAERG, R.J. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, v. 45, n. 2, p. 212–17, 1997.

ELLSTRAND, N.C. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. **Annual Review of Ecology Systematic**, v. 30, v. s/n, p. 539-563, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solo: Embrapa Solos**, 2006. 306 p.

ENDO, M.; SHIMIZU, T.; FUJIMORI, T.; YANAGISAWA, S.; TOKI, S. Herbicide-Resistant Mutations in Acetolactate Synthase Can Reduce Feedback Inhibition and Lead to Accumulation of Branched-Chain Amino Acids. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 5, p. 522-528, 2013.

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

FERREIRA, E.A.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; VARGAS, L.; REIS, M.R. Glyphosate no controle de biótipos de azevém e impacto na microbiota do solo. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 573-578, 2006.

FERREIRA, E.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.A.; REIS, M.R.; VARGAS, L.; VIANA, R.G.; GUIMARÃES, A.A.; GALON, L. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta daninha**, v.26, n. 2, p. 261-269, 2008.

FRAGA, D.S.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; NOHATTO, M.A.; THÜRMER, L.; HOLZ, M.T. Adaptive value of ryegrass biotypes with low-level resistance and susceptible to the herbicide fluazifop and competitive ability with the wheat culture. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 875-885, 2013.

HALL, L.M.; STROME, K.M.; MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C. Resistance to acetolactate sintase inhibitors and quinclorac in a biotypes of false clover (*Gallium sourium*). **Weed Science**, v.46, n.4, p.390-396, 1998.

HANNAWAY, D.B.; COOL, M. **Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)**, 2004. Disponível em: http://forages.oregonstate.edu/php/fact_sheet_print_grass.php?SpecID=2&use= Acesso em: 18 de janeiro de 2014.

HARPER, J.L. **Population biology of plants**. London: Academic Press, 1977. 892p.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 13 de março de 2014.

HOFFMAN, M.L.; BUHLER, D.D. Utilizing *Sorghum* as functional model of crop-weed competition. I. Establishing a competitive hierarchy. **Weed Science**, v.50, n.4, p.466-472, 2002.

IMAIZUMI, T.; WANG, G.X.; TOMINAGA, T. Inheritance of sulfonylurea resistance in *Monochoria vaginalis*. **Weed Research**, v. 48, n. 5, p. 448-454, 2008.

JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v.44, n.1, p.176-193, 1996.

KALOUMENOS, S.; TSIONI, V.C.; DALIANI, E.G.; PAPAVALASSILEIOU, S.E.; VASSILEIOU, A.G.; LAOUTIDOU, P.N.; ELEFTHEROHORINOS, I.G. Multiple Pro-197 substitutions in the acetolactate synthase of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and

their impact on chlorsulfuron activity and plant growth. **Crop Protection**, v. 38, n. s/n, p. 35-43, 2012.

KAUNDUN, S.S.; BAILLY, G.C.; DALE, R.P.; HUTCHINGS, S-J; MCINDOE, E. A Novel W1999S Mutation and Non-Target Site Resistance Impact on Acetyl-CoA Carboxylase Inhibiting Herbicides to Varying Degrees in a UK *Lolium multiflorum* Population. **Plos one**, v. 8, n. 2, e58012, 2013.

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

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

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A.; BURGOS, N.R. Competitiveness of ALS inhibitor resistant and susceptible biotypes of greater beggarticks (*Bidens subalternans*). **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 457–464, 2011.

LEE, Y.T.; DUGGLEBY, R.G. Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. **Biochemistry**, v. 40, n. 23, p. 6836-6844, 2001.

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

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

MAGALHÃES, A.C.N. **Análise quantitativa do crescimento**. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal. EPU/EDUSP, São Paulo. 1979. v. 1, p. 331-350.

MATZENBACHER, F O.; MEROTTO JR., A.; LEGUISANO, A.M.; WAGNER, J.F.; MENEZES, V.G. Efeito de inibidores de metabolização em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente a imidazolinonas. In: VII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2011, Balneário Camburiú (SC). **Anais**. Itajaí (SC): Epagri, 2011. v. 1. p. 345-348.

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

NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; POSTON, D.H.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. **Weed Science**, v. 56, n. 3, p. 344-349, 2008.

- NELSON, D.L.; COX, M.M. Enzimas. In: **Lehninger princípio de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: SARVIER, 2006, p.1202.
- NEVE, P.; VILA-AIUB, M.M.; ROUX, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Physiologist**, v. 184, n. 4, p. 783–793, 2009.
- OERKE, E.C. Crop loss to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.
- PANG, S.S.; DUGGLEBY, R.G. Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. **Biochemistry Journal**, v. 357, n. 3, p. 749-757, 2001.
- PASSINI, T.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; YADA, I.F.U. Competitivity of the common-bean plant relative to the weed alexandergrass [*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitch.] **Scientia Agricola**, v. 60, n. 2, p.259-268, 2003.
- PAULA, J.M.; AGOSTINETTO, D.; SCHAEGLER, C.E.; VARGAS, L.; SILVA, D.R.O. Competição de trigo com azevém em função de épocas de aplicação e doses de nitrogênio. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 557-563, 2011.
- POWLES, S.; HOLTUM, J. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. New York: CRC Press, 1994. 353p.
- POWLES, S.B., YU, Q. Evolution in Action: Plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. s/n, p. 317-347, 2010.
- PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 88, n. 1, p. 8–13, p. 2002.
- 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. Methods to study interactions among crops and weeds. **Weed Technology**, v.1, n.3, p.190-198, 1987.
- RADOSEVICH, S.R.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Ecology of weeds and invasive plants**: Relationship to agriculture and natural resource management. 3.ed. John Wiley & Sons, 2007. 454p.
- RADOSEVICH, S.R.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology**: implications for vegetation management. 2. ed. Wiley, 1997. 589p.
- RIGOLI, R.P.; AGOSTINETTO, D.; SCHAEGLER, C.E.; DAL MAGRO, T.; TIRONI, S. Habilidade competitiva de trigo (*Triticum aestivum*) em convivência com azevém (*Lolium multiflorum*) ou nabo (*Raphanus raphanistrum*). **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2008.

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; PRIMIANI, M.M. Mechanism of sulfonylurea herbicide resistance in the broadleaf weed, *Kochia scoparia*. **Plant Physiology**, v. 93, n. 1, p. 55-61, 1990.

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; SMITH, W.F.; PRIMIANI, M.M. Sulfonylurea Herbicide Resistance in Common Chickweed, Perennial Ryegrass, and Russian Thistle. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 42, n. 2, p. 110-118, 1992.

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; THILL, D.C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicide, in **Herbicide Resistance in Plants, Biology and Biochemistry**, ed. by Powles, S.B. and Holtum, J.A.M.. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p. 83–139 1994.

SCHAEGLER, C.E.; NOLDIN, J.A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T.; FONTANA, L.C. Germination and growth of *Fimbristylis miliacea* biotypes resistant and susceptible to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p. 687-694, 2013.

SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v.9, n.2, p.218-227, 1995.

SENSEMAN, S.A. (Ed.). **Herbicide handbook**. 9.ed. Lawrence: Weed Science Society of America, 2007. 458 p.

SIBONY, M.; B. RUBIN. The ecological fitness of ALS-resistant *Amaranthus retroflexus* and multiple-resistant *Amaranthus blitoides*. **Weed Research**, v. 43, n. 1, p. 40–47, 2003.

SIGMAPLOT – **Scientific Graphing Software**. Version 10.0, 2007.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 935–944, 1995.

SINGH, B.K.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Assay of acetohydroxyacid synthase. **Analytical Biochemistry**, v.171, n.1, p. 173-179, 1988.

SILVA, J.M.B.V. Da. **Avaliação da distribuição geográfica de biótipos de azevém anual resistente a herbicidas no Estado do Rio Grande do Sul**. 2012. 37 f. Dissertação (Mestrado em Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre, 2004. 400p.

STORCK, L., LOPES, S.J., LÚCIO, A.D. **Introdução à Experimentação**. Santa Maria: Departamento de Fitotecnia/UFSM, 2001, 54p.

SWEETSER, P.B.; SCHOW, G.S.; HUTCHINSON, J.M. Metabolism of chlorsulfuron by plants: Biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 17, n. 1, p. 8-23, 1982.

TAN, M.K.; PRESTON, C.; WANG, G.X. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Weed Research**, v. 47, n. 6, p. 534–541, 2007.

TANAKA, Y. Properties of acetolactate synthase from sulfonylurea resistant *Scirpus juncooides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 3, p. 147–153, 2003.

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, 2006.

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

VAN EERD, L.L.; M C LEAN, M.D.; STEPHENSON, G.R.; HALL, J.C. Resistance to quinclorac and ALS-inhibitor herbicides in *Galium spurium* is conferred by two distinct genes. **Weed Research**, v. 44, n. 5, p. 355-365, 2004.

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

VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 567-571, 2007.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.23, n.1, p.153-160, 2005.

VARGAS, L.; SILVA, A.A. da. Resistência de *Euphorbia heterophylla* a herbicidas inibidores da ALS. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.) **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, 2009. p. 352.

VARGAS, L.; SILVA da A.A.; AGOSTINETTO, D.; GAZZIERO, D. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: AGOSTINETTO, R.; VARGAS, L. (ed). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Gráfica Berthier, 2009, p. 352.

VENCILL, W.K.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; SOTERES, J.K.; MALLORY-SMITH, C.; BURGOS, N.R.; JOHNSON, W.G.; MCCLELLAND, M.R. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide resistant crops. **Weed Science**, v. 60, n. 1, p. 2-30, 2012.

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

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, p. 751–767, 2009b.

VILA-AIUB, M.M.; GUNDEL, P.E.; YU, Q.; POWLES, S.B. Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 228-232, 2013.

WANG, G.X.; WATANABE, H.; UCHINO, A.; ZHOU, J.; ITOH, K. Inheritance of sulfonylurea resistance in a paddy weed, *Monochoria korsakowii*. **Journal of Pesticide Science**, 28, n. 2, p. 212– 214, 2003.

YU, Q. ; HAN, H.; POWLES, S.B. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. **Pest Management Science**, v. 64, n.12, p. 1229–1236, 2008.

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.; 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 & 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.

VITA

Franciele Mariani é filha de Sady Mariani e Lisane Maria Mariani. Nasceu em 05 de fevereiro de 1984, no Município de Chapada, Rio Grande do Sul. Formou-se no Instituto Júlia Biliart de Chapada/RS, no ano de 2001. No ano de 2003 ingressou no curso de Agronomia da Universidade de Passo Fundo (UPF), onde se graduou como Engenheira Agrônoma em 2007. No período de 2004 a 2007 desenvolveu atividades como estagiária e bolsista de Iniciação Científica, atuando na área de horticultura, com ênfase em cultivo do morangueiro. No período de 2008 a 2010 cursou o mestrado em Agronomia na UPF, área de concentração em Produção Vegetal, com dissertação intitulada: Estabelecimento de *Panicum maximum* e *Urochloa brizantha* com milho ou soja e cultivo em sucessão de trigo e aveia preta, sob orientação do Dr. Renato Serena Fontaneli. Em 2010, iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel, com tese intitulada: Caracterização de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), sob orientação do Dr. Leandro Vargas. Como formação complementar do doutorado, estudou na Texas A&M University-EUA, durante o período de agosto de 2012 à julho de 2013, sob orientação do Ph.D. Scott Allen Senseman.