

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Caracterização de biótipos de *Raphanus sativus* L.
resistentes e suscetível a herbicidas inibidores da enzima
acetolactato sintase**

Joanei Cechin

Pelotas, 2015

JOANEI CECHIN

Caracterização de biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes e suscetível a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase

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

Orientador: Dr. Leandro Vargas

Coorientadores: Dr. Dirceu Agostinetto

Dr^a. Fabiane Pinto Lamego

Pelotas, 2015

Banca examinadora:

Eng. Agr. Dr^a. Taísa Dal Magro

Bióloga. Dr^a. Juliana Aparecida Fernando

Eng. Agr. Dr. Dirceu Agostinetto
(Coorientador)

Eng. Agr. Dr. Leandro Vargas
(Orientador)

Aos meus pais, João Batista e Neuza Maria;
A minha irmã, Jenesca.
A minha avó Luiza.
Aos meus padrinhos e afilhados.
Aos meus amigos (as).

OFEREÇO E DEDICO

"Se você encontrar um caminho sem obstáculos,
ele provavelmente não levará a lugar nenhum".
(Frank A. Clark)

Agradecimentos

À Deus, pela vida e por ter guiado meus caminhos e minhas decisões para que eu obtivesse sucesso em mais essa etapa da minha vida.

À minha família, pelo incentivo, apoio, compreensão e carinho, sem a qual não teria realizado esta etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Santa Maria, que me proporcionou formação educacional e pessoal, em especial aos professores Dr. Sérgio Luiz de Oliveira Machado e Dr. Nelson Diehl Kruse pelos ensinamentos que levarei sempre comigo.

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

Ao professor Dr. Leandro Vargas pela orientação, apoio em todos os momentos, pelo conhecimento compartilhado, dedicação, confiança, convivência, pela amizade e estímulo no dia-a-dia.

Aos professores Dr. Dirceu Agostinetto e Dra. Fabiane Pinto Lamego por toda a ajuda e coorientação, a todos os ensinamentos, conselhos, incentivo, amizade e confiança proporcionados.

À Professora Dr. Caroline Scherer por disponibilizar do seu tempo para auxílio na identificação da espécie e por ajudar na confecção das exsicatas.

Aos professores Dra. Taísa Dal Magro e Dr. Fernando Machado dos Santos pela amizade, convívio e auxílio na execução em alguns experimentos.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Centro de Estudos em Herbologia e, a Embrapa Trigo pela disponibilização das suas instalações para a realização dos experimentos.

À funcionária Neide Alessandra Ritter Quevedo por todos os momentos de convívio e auxílio durante a realização do mestrado.

Aos funcionários e estagiários da Embrapa Trigo: Alana Prigol, Airton Munz, Andrea Ferreira Hoffmann, Everson S. Flores, Felipe Pilge, Miria Durigon e Odirlei Dalla Costa pela amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação: Ana Claudia Langaro, André da Rosa Ulguim, Andrés Monge Vargas, Bruno Moncks da Silva, Camila Peligrinotti Tarouco, Claudia de Oliveira, Daiane Benemann, Diego Severo Fraga, Fernanda Cassiane Caratti, Francieli Mariani, Geison Aisenberg, Jader Job Franco, Laís Tessari Perboni, Marcos André Nohatto, Mariane Pertile, Nixon Westendorff, Queli Ruchel, Renan Ricardo Zandoná, Theodoro Schneider e Vinicius Zimmer, pela amizade, incentivo e auxílio na execução dos experimentos.

Aos bolsistas e estagiários do Centro de Herbologia (CEHERB): Ana Marina Pedrolo, Daniela Tessaro, Gabriel Klafke Gossler, Gustavo Gabriel Dal Forno, Humberto Farias, Jéssica Dias Gomes, Jéssica Rodrigues Garcia, João Ribeiro Moraes, Lucas Thürmer, Marcelo Timm, Sandro Roberto Piesanti e Thiago Vieira Duarte pela amizade, incentivo, momentos de convívio e auxílio na execução dos experimentos.

Aos ex-colegas do Setor de Herbologia da Universidade Federal de Santa Maria, em especial, ao André Guareschi pela amizade compartilhada, por proporcionar troca de conhecimentos e companheirismo.

Minha gratidão aos meus amigos Anderson Bolzan, Giovani Smaniotto, Luciano Stöhlirck e Mateus Pino pela amizade e convívio durante o período em Pelotas. Estendo meu obrigado à amiga Jamile Mainardi pela sua amizade.

Ao amigo Paulo Vicente Rossler pelo acolhimento e amizade durante o período vivido em Passo Fundo.

Meu agradecimento estende-se aos amigos de Santa Maria pelos momentos convvidos nesses anos e por compartilhar deste momento. Ao Alessandro Azevedo, Andressa Lucca, Daniel Negrini, Greice Roberta Predebon, Gustavo Rossini, Joanita Cecchin Donaduzzi, Juciele Noal, Juliano Moro, Karin Dalla Pozza, Luís Garcia Guimarães, Marilise Peruzzo, Mateus Negrini e Sílvia Cordenonsi.

Minha gratidão aos meus amigos de Pelotas, em especial ao Anderson Reis, Emerson Lenz, Henrique Roberto Maldaner, Ricardo Braun Marangon, Ronan Ritter, Rudmar Seiter e Tales Franchi pelo apoio e pela amizade nesse período de curso.

A todos, o meu muito obrigado!

Resumo

CECHIN, Joanei. **Caracterização de biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes e suscetível a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase** 2015. 99f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Raphanus sativus (nabo) é uma espécie de inverno que se caracteriza como planta daninha, podendo ser usada como cobertura de solo, antes dos cultivos de inverno e verão. Sua presença, como planta daninha, em áreas destinadas à produção de grãos pode causar prejuízos, devido a sua capacidade de competição. Esta espécie é normalmente controlada com herbicidas inibidores da enzima ALS como o iodosulfurom-metílico que, devido o uso continuado, selecionou biótipos resistentes. Diante disso, os objetivos da pesquisa foram determinar a dose necessária para controlar 50% da população (C_{50}) e reduzir 50% da produção de massa da matéria seca da parte aérea (GR_{50}) dos biótipos resistentes, em relação ao biótipo suscetível; verificar herbicidas alternativos para controle de biótipos resistentes; verificar o mecanismo de resistência através da atividade da enzima ALS, do sequenciamento do gene da enzima ALS e da resposta dos biótipos à aplicação de inibidores do metabolismo da citocromo P_{450} monooxigenase; e, estimar o valor adaptativo dos biótipos suscetível e resistentes ao iodosulfurom-metílico. Para isso, foram realizados experimentos em casa de vegetação e laboratórios pertencentes à UFPel e Embrapa Trigo, utilizando sementes de nabo coletadas em lavouras do norte e noroeste gaúcho onde ocorreram falhas de controle após o uso do iodosulfurom-metílico. Os resultados demonstram que, para obter-se controle equivalente dos biótipos resistentes B_4 e B_{13} , é necessária dose de iodosulfurom-metílico superior a 89 e 252 vezes àquela necessária para o biótipo suscetível (B_1). Os biótipos B_4 e B_{13} são controlados com os herbicidas alternativos glufosinato de amônio, dicloreto de paraquate, diurom+dicloreto de paraquate, glifosato, saflufenacil, metribuzim, bentazona, 2,4-D amina, mesotriona, tembotriona, atrazina e fomesafem, pertencentes a mecanismos de ação distintos. Todavia, os biótipos B_4 e B_{13} apresentam resistência a metsulfurom-metílico, nicosulfurom, clorimurom-etílico, imazetapir, cloransulam-metílico, flucarbazona sódio e bispiribaque-sódico, todos herbicidas inibidores da enzima ALS, confirmando a resistência cruzada. No ensaio da atividade da enzima ALS, os biótipos de nabo apresentam similar afinidade com a enzima, entretanto B_4 e B_{13} apresentam $V_{máx}$ superior quando comparados ao suscetível; a inibição da atividade da enzima ALS na presença do herbicida iodosulfurom-metílico mostrou que para 50% da inibição são necessários

0,65 e 0,82 μM para o B₄ e B₁₃ respectivamente, resultando num fator de resistência de 15 e 19 quando comparados com o B₁. Constatou-se que os biótipos resistentes apresentaram mutação da Trp₅₇₄ com substituição do aminoácido Triptofano por Leucina confirmando que a resistência deve-se a insensibilidade da enzima ALS. Observou-se a ocorrência de mutações silenciosas na Ala₁₂₂ em todos os biótipos onde o códon GCC foi substituído por GCT sem resultar em alteração do aminoácido. Os biótipos não apresentam metabolismo do iodosulfurom-metílico pelo complexo citocromo P₄₅₀ quando inibidos pelos inseticidas malathion ou butóxido de piperonila (PBO). Os biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistentes (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio, em geral, apresentaram valor adaptativo similar.

Palavras-chave: Nabo. Iodosulfurom-metílico. Mutação de resistência ALS. Valor adaptativo.

Abstract

CECHIN, Joanei. **Characterization biotypes of *Raphanus sativus* L. resistant and susceptible to inhibiting herbicides acetolactate synthase**. 2015. 99f. Master of Science - Graduate Program in Plant Protection. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Raphanus sativus L. (fodder radish) is a winter's plant specie which is characterized as weed and can be used as ground cover, before winter and summer crops. Its presence, like weed on areas for grain production can cause damage due to its ability to compete. This specie is normally controlled with ALS inhibitor herbicides such as enzyme-methyl iodosulfurom that due to the continued use have selected resistant biotypes. Therefore, the research objectives were to determine the required dose to control 50% of the population (C_{50}) and reduce 50% of the mass production of dry matter of shoots (GR_{50}) of resistant biotypes, for the susceptible biotype; check alternative herbicides for control of resistant biotypes; determine the resistance mechanism through the activity of the ALS enzyme, gene sequencing of the ALS enzyme response biotypes and applying the cytochrome P_{450} monooxygenase inhibitor metabolism; and estimate the adaptive value of susceptible and resistant biotypes to iodosulfurom methyl-sodium. Thus, experiments were performed in a greenhouse and laboratories atUFPEl (Federal University of Pelotas, Pelotas - RS) and Embrapa Trigo (Brazilian Agricultural Research Corporation, Passo Fundo – RS) using fodder radish seeds collected in northern and northwest crop fields of Rio Grande do Sul state, where control failures occurred after the use of iodosulfurom methyl sodium. The results demonstrate that to obtain equivalent control of resistant biotypes (B_4 and B_{13}), the required dose of iodosulfurom methyl sodium is 89 and 252 times higher than the required for the susceptible biotype (B_1), respectively. Biotypes B_4 and B_{13} are controlled with the alternative herbicides glufosinate ammonium, paraquat dichloride, diuron + paraquat dichloride, glyphosate, saflufenacil, metribuzin, bentazon, 2,4-D amine, mesotrione, tembotrione, atrazine and fomesafen belonging to distinct mechanisms of action. However, B_4 and B_{13} biotypes show resistance to metsulfurom-methyl, nicosulfuron, chlorimurom-ethyl, imazethapyr, cloransulam-methyl, flucarbazone sodium and bispyribac-sodium, all inhibitors of ALS enzyme, confirming the cross-resistance. In the assay of ALS enzyme activity, fodder radish biotypes have similar affinity for the enzyme, however B_4 and B_{13} have greater V_{max} when compared to B_1 ; inhibiting ALS enzyme activity in the presence of iodosulfurom methyl-sodium herbicide to obtain 50% inhibition required 0.65 and 0.82 μM for B_4 and B_{13} respectively, resulting in a resistance factor of 15 and 19 compared with B_1 . It was verified that mutation of resistant biotypes

presented a Trp₅₇₄ substitution by leucine , confirming that the resistance was due to insensitivity of the ALS enzyme. Silent mutations in Ala₁₂₂ were observed in all biotypes where the codon GCC was substituted for GCT without causing changes in the amino acid. Biotypes have no metabolism of iodosulfurom methyl-sodium by cytochrome P₄₅₀ complex when inhibited by the insecticide malathion or piperonyl butoxide (PBO). The fodder radish susceptible biotypes (B₁) and resistant (B₄) to iodosulfurom-methyl herbicide sodium generally had similar fitness.

Key-words: Fodder radish. Iodosulfuron-methyl sodium. ALS resistance mutation. Fitness.

Lista de Figuras

- Figura 1-** Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com os locais de coleta das sementes de nabo com suspeita de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015. 30
- Figura 2-** Controle visual (%) de biótipos de nabo, suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 14 dias após aplicação dos tratamentos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 37
- Figura 3-** Controle visual (%) de biótipos de nabo, suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 38
- Figura 4-** MMSPA (%) de biótipos de nabo, suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após aplicação do tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 39
- Figura 5-** Curva padrão de acetoína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 60
- Figura 6-** Curva padrão de proteína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 60
- Figura 7-** Atividade da enzima ALS ($\mu\text{M mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) ao herbicida iodosulfurom-metílico em função da concentração de piruvato (mM) para cálculo do K_m e $V_{\text{máx}}$. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 61

Figura 8-	Inibição <i>in vitro</i> da atividade da enzima ALS (%) em biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) submetido a doses (μM) do herbicida iodosulfurom-metílico. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	64
Figura 9-	Estatura (cm planta ⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliada dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	75
Figura 10-	Massa da matéria seca da parte aérea (g planta ⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	76
Figura 11-	Massa seca de raiz média (g planta ⁻¹) dos biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015..	77
Figura 12-	Massa seca total (g planta ⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	78
Figura 13-	Razão de área foliar (cm ² g ⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	79
Figura 14-	Taxa de crescimento (g planta ⁻¹ dia ⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	80
Figura 15-	Taxa de crescimento relativo de biótipos de nabo suscetível (B ₁) e resistente (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	81

Lista de Tabelas

- Tabela 1-** Localização e resposta de biótipos de *Raphanus sativus* em função da aplicação de 4,0 g i.a. ha⁻¹ de iodosulfurom-metílico avaliado visualmente aos 28 dias após aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 31
- Tabela 2-** Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo e/ou equivalente ácido, produto comercial e dose dos herbicidas (g i.a. ha⁻¹) utilizados nos tratamentos em pré-semeadura das culturas (dessecação) para controle de biótipos de *Raphanus sativus*. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015. 34
- Tabela 3-** Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas (g i.a. ha⁻¹) utilizados nos tratamentos em pós-emergência da cultura do trigo, milho e soja (seletivos) para controle de biótipos de *Raphanus sativus*. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015. 34
- Tabela 4-** Grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas (g i.a. ha⁻¹) utilizados nos tratamentos para confirmação da resistência cruzada em biótipos de *Raphanus sativus*. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015. 35
- Tabela 5-** Valores do C₅₀ com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015. 37

Tabela 6-	Valores do C ₅₀ com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.....	38
Tabela 7-	Valores do GR ₅₀ com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) submetidos a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos(DAA). FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.....	40
Tabela 8-	Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA) de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do trigo. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.....	41
Tabela 9-	MMSPA (g planta ⁻¹) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do trigo. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.....	42
Tabela 10-	Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA) de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do milho. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	43
Tabela 11-	MMSPA (g planta ⁻¹) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do milho. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	44
Tabela 12-	Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA) de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura da soja. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	45
Tabela 13-	MMSPA (g planta ⁻¹) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura da soja. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	46

Tabela 14-	Controle (%) de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico submetidos aos diferentes grupos químicos avaliado aos 14 dias após aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.....	47
Tabela 15-	Controle (%) e MMSPA (g) de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico submetidos aos diferentes grupos químicos da ALS avaliado aos 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.....	48
Tabela 16-	Primers usados para sequenciamento do gene da ALS em biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. FAEM/UFPel. Capão do Leão, RS, 2015.	57
Tabela 17-	Valores de K _m (mM) e V _{máx} (μmol mg ⁻¹ proteína h ⁻¹) de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico. FAEM/UFPel. Capão do Leão, RS, 2015.	62
Tabela 18-	Valores do I ₅₀ com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	64
Tabela 19-	Comparação das sequências parciais do gene da enzima Acetolactato sintase (ALS) dos biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico e sua correspondente sequência de aminoácidos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.....	66
Tabela 20-	Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) em gramas planta ⁻¹ de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄ e B ₁₃), submetidos à aplicação de herbicida iodosulfurom-metílico, isolado ou antecedido em trinta minutos da aplicação dos inibidores do citocromo P ₄₅₀ monooxigenase (malathion e PBO) e testemunha sem aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	68

Tabela 21- Número de flores por planta (NFP), número de siliquas por planta (NSP) e número de sementes por planta de <i>Raphanus sativus</i> L. (nabo) suscetível (B ₁) e resistentes (B ₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, em resposta ao fator biótipo. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.	82
---	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
2. CAPÍTULO I – Resistência de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio e controle alternativo em trigo, milho e soja.....	26
2.1 Introdução ..	26
2.2 Material e Métodos	29
2.3 Resultados e Discussão	36
2.4 Conclusões ...	49
3. CAPÍTULO II – Alterações na enzima Acetolactato sintase e o mecanismo envolvido na resistência de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. ao herbicida iodosulfurom-metílico	50
3.1 Introdução	50
3.2 Material e Métodos	53
3.3 Resultados e Discussão	59
3.4 Conclusões	69
4. CAPÍTULO III – Valor adaptativo de biótipos de <i>Raphanus sativus</i> L. resistente e suscetível a herbicidas inibidores da ALS.....	70
4.1 Introdução	70
4.2 Material e Métodos	72
4.3 Resultados e Discussão	74
4.4 Conclusões	83
5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS.....	86
Vita	99

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o quarto maior produtor mundial de alimentos com 193,46 milhões de toneladas de grãos produzidas em mais de 56 milhões de hectares (FAO, 2015). Áreas destinadas à produção no Sul do Brasil predominam sistemas de cultivo com soja ou milho no verão e, com trigo ou espécies de cobertura durante a estação fria (SILVA et al., 2006).

O *Raphanus sativus* L. (nabo) é uma espécie dicotiledônea pertencente à família Brassicaceae que possui fecundação cruzada e se desenvolve em ambientes temperados e subtropicais (KISSMANN, 2007). É considerada espécie de cobertura de solo importante nos sistemas agrícolas do Sul do Brasil, utilizada no período que antecede os cultivos de inverno e verão por apresentar rápido crescimento e elevada taxa de mineralização (AMADO; MIELNICZUK; AITA, 2002), por ser descompactadora de solos (MUZILLI, 2002) e pela capacidade de supressão de plantas daninhas (BALBINOT JUNIOR; MORAES; BACKES, 2007). Entretanto, o nabo é uma das principais plantas daninhas dicotiledôneas dos cereais de inverno do Sul do Brasil (VARGAS, ROMAM, 2005), causando prejuízos consideráveis às culturas devido a sua elevada capacidade de competição (RIGOLI et al., 2008), acarretando em redução na produtividade (LAMEGO et al., 2004).

Para isso, a utilização de herbicidas em áreas agrícolas consiste numa prática importante para manejo eficiente desta e de outras espécies daninhas (BUSI et al., 2011). Com mais de 30% dos herbicidas registrados para uso na agricultura no mundo (MCCOURT et al., 2006), os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) são essenciais no controle de diversas plantas daninhas. Sua ampla utilização deve-se à seletividade à diversas culturas, baixas doses de aplicação e, alguns, por apresentarem baixa toxicidade aos animais (TAN; EVANS; SINGH, 2006; ENDO et al., 2013).

O manejo adequado do nabo é uma etapa importante dentro dos sistemas produtivos sendo geralmente realizado com herbicidas inibidores da enzima ALS (THEISEN, 2008), como é caso do iodosulfurom-metílico e do metsulfurom-metílico, pertencentes ao grupo químico das sulfonilureias. Estes herbicidas agem inibindo a enzima ALS interrompendo a síntese dos aminoácidos de cadeia lateral valina, leucina e isoleucina (ROMAN et al.; 2007). A enzima ALS é responsável por catalisar a condensação de duas moléculas de piruvato para formar acetolactato (precursor de valina e leucina) e por condensar o piruvato e cetobutirato para formar aceto-hidrobutirato (precursor de isoleucina) (TRANEL; WRIGHT, 2002; ROMAN et al., 2007; DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008).

Embora sejam herbicidas eficazes no controle de nabo, o uso excessivo de único mecanismo de ação possibilitou a evolução e o surgimento de biótipos resistentes (THEISEN, 2008; PANDOLFO et al., 2013). Estes biótipos, quando não mais controlados, têm a capacidade de reproduzir-se e disseminar novos indivíduos que contribuem no agravamento do problema (VARGAS et al., 2009).

No mundo, os primeiros casos de nabo resistente ocorreram no ano de 1997, na África do Sul e na Austrália (HEAP, 2015). Atualmente, com o problema da resistência intensificado, há relatos de biótipos com resistência múltipla a cinco mecanismos de ação distintos (HASHEM et al., 2001; WALSH et al., 2004; JUGULAM et al., 2013; ASHWORTH et al., 2014).

O primeiro registro de nabo resistente no Brasil ocorreu em 2001, em lavouras de trigo no Rio Grande do Sul, onde os biótipos resistentes coletados sobreviveram à aplicação dos herbicidas clorimurom-etílico, cloransulam-metílico, imazetapir, metsulfurom-metílico e nicosulfurom (THEISEN, 2004).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas ocasiona alterações nos biótipos resistentes quando comparados a biótipos suscetíveis. Alguns trabalhos evidenciam a necessidade de doses maiores de herbicidas inibidores de ALS para controlar biótipos de nabo resistente (THEISEN, 2008; PANDOLFO et al., 2013; COSTA; RIZZARDI, 2014), o que pode tornar o controle caro e inviabilizar o uso de alguns herbicidas (MONJARDINO; PANNELL; POWLES, 2003).

O diagnóstico de plantas daninhas resistentes é importante para evitar a disseminação e propor estratégias de manejo sustentáveis para agricultura. As respostas de biótipos resistentes quando submetidos a herbicidas podem ser obtidas através das curvas de dose resposta que informam a dose para controlar 50% da

população (C_{50}) e a dose que possibilita reduzir 50% da massa seca (GR_{50}) de biótipos resistentes e suscetíveis permitindo o cálculo do fator de resistência (FR) (CHRISOFFOLETI, 2002).

Estratégias de manejo químico para biótipos resistentes a herbicidas podem ser realizadas através do uso de herbicidas com diferentes mecanismos de ação ou através da associação de herbicidas com mecanismos distintos (POWLES; YU, 2010). No caso do nabo resistente, a antecipação da dessecação e o uso de herbicidas alternativos são ferramentas que podem melhorar o controle (THEISEN et al., 2008). Oliveira Neto et al., (2010) ressaltam que esta prática pode ser considerada eficaz no controle de plantas daninhas resistentes, além de evitar o surgimento e a seleção de novos biótipos resistentes.

Com a resistência detectada, a elucidação do mecanismo envolvido torna-se importante, pois permite determinar alternativas de manejo que possibilitem diminuir a pressão de seleção. Os mecanismos responsáveis pela resistência de plantas daninhas a herbicidas podem estar relacionados ao local de ação e não da enzima alvo (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007). Em ambos os mecanismos, a eficácia do herbicida fica comprometida, estando relacionada ao grupo químico e ao modo de ação de cada herbicida (DÉYLE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013a). Entretanto, é necessário examinar ambos os mecanismos considerando a possibilidade de coexistência em biótipos resistentes (AHMAD-HAMDANI et al., 2013).

Em geral, biótipos resistentes a herbicidas inibidores da enzima ALS apresentam mutação do gene que codifica a enzima, resultando em redução da sensibilidade desta aos herbicidas (TRANEL; WRIGHT, 2002; TAN; MEDD, 2002; WARWICK; SAUDER; BECKIE, 2005; CHRISTOFFERS et al., 2006; TRUCCO; HAGER; TRANEL, 2006; HAN et al., 2012). Este mecanismo molecular, por envolver enzimas específicas, torna-se fácil de ser analisado (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007). Sua identificação dá-se através de estudos da atividade da enzima ALS que permite avaliar a funcionalidade da enzima, podendo resultar em insuficiente ou excessivo produto da biossíntese (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b).

A presença de pontos de mutação no gene e a substituição específica de um aminoácido na enzima podem afetar a estrutura e a função da ALS, reduzindo sua atividade (EBERLIEN et al., 1997; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013). Na maioria dos casos reportados de resistência aos inibidores da enzima ALS, o envolvimento de um único ponto de mutação no gene alvo reduz a afinidade da

enzima ao herbicida (BURGOS et al., 2013) e, dessa forma, reduzir a habilidade do herbicida em interagir com o sítio de ação (LAMEGO et al., 2009; HAN et al., 2012). Entretanto, 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).

Em populações de nabo resistente a herbicidas inibidores da ALS diversos pontos de mutação no gene que altera o local de ação têm sido identificados (YU et al., 2003; POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2012; YU et al., 2012). Mutações na Pro₁₉₇, Asp₃₇₆, Trp₅₇₄ e Ala₁₂₂ foram diagnosticadas, sendo a Ala₁₂₂ a menos comum, pois são necessárias duas alterações de nucleotídeos enquanto as demais exigem apenas uma alteração de nucleotídeo (YU et al., 2003; 2012). Geralmente, mutações na Pro₁₉₇ conferem resistência ao grupo químico das sulfonilureias e das triazolopirimidinas, enquanto que mutações da Ala₁₂₂ conferem resistência a estes e ao grupo químico das imidazolinonas. Já, mutações do Asp₃₇₆ e do Trp₅₇₄ podem conferir amplo espectro de resistência a herbicidas inibidores da ALS (TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2015). A alteração gênica em vários pontos pode reduzir e dificultar as opções para controle de plantas daninhas com herbicidas inibidores da enzima ALS, especialmente em casos já reportados em *Raphanus raphanistrum* L. (YU et al., 2012).

A resistência não relacionada ao local de ação da enzima alvo pode ocorrer via redução da absorção, redução ou aumento da translocação e aumento da metabolização ou compartimentalização do herbicida (POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2014). Plantas resistentes a herbicidas que apresentam este mecanismo tendem a acelerar a degradação do herbicida por meio do aumento da atividade da glutatona-s-transferase, da citocromo P₄₅₀ ou da glicosil-transferase (DÉLYE, 2013b). Culturas e plantas daninhas possuem sistemas enzimáticos que metabolizam os herbicidas, sendo a citocromo P₄₅₀ uma das mais importantes rotas na metabolização de herbicidas como causa de resistência (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007).

Em plantas, a citocromo P₄₅₀ atua em funções fisiológicas e na detoxificação de substâncias químicas nocivas, como é o caso de herbicidas (POWLES; YU, 2010). Este tipo de mecanismo de resistência pode ser estudado utilizando

inibidores específicos da citocromo P_{450} como é o caso do inseticida malathion e do butóxido de piperolina, onde atuam como sinergistas a herbicidas (YU; POWLES, 2014a). A inibição ocorre devido à liberação do enxofre pela molécula do inseticida que inibe a apoproteína P_{450} (WERCK-REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000). A capacidade de metabolização da planta daninha permite sua sobrevivência podendo ser induzida com a utilização de sub-doses e, potencializados em espécies que apresentam fecundação cruzada resultando em altos níveis de resistência dentro de algumas gerações (YU; POWLES, 2014b).

A resistência por ser uma característica herdável, permite a sobrevivência de biótipos a herbicidas (VARGAS et al., 2009) onde práticas de manejo que visam controlar plantas daninhas podem resultar em aumento da pressão de seleção e influenciar na evolução de características adaptativas de uma população (DÉLYE et al., 2013b) alterando a competitividade do biótipo e da sua dinâmica na população (CHRISTOFFOLETI, 2001; VARGAS et al., 2009). As plantas daninhas utilizam e aportam basicamente seus recursos para reprodução, crescimento e funções de defesa (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2005), onde os efeitos pleiotrópicos podem ser positivos ou negativos, dependendo do ambiente e do alelo relacionado (BERGELSON; PURRINGTON, 1996; MENCHARI et al., 2008; VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a; LI et al., 2013; DÉYLE et al., 2013c).

Os estudos de adaptabilidade ou valor adaptativo (“*fitness*”) de uma espécie constituem-se em importante ferramenta para entender o comportamento sobre os componentes de crescimento, sobrevivência e produção de sementes viáveis das espécies, em função do aproveitamento dos recursos de crescimento em determinado nicho ecológico (RADOSEVICH et al., 2007), além de ser indicativo da capacidade de infestação de um biótipo numa área. As principais alterações que os biótipos podem expressar em relação ao valor adaptativo são: redução na taxa de crescimento, atividade fotossintética diferenciada, reduzida capacidade de competir por recursos e em produzir sementes (AHRI, 2013). Contudo, os estudos de adaptabilidade devem preconizar a utilização de biótipos provenientes de uma mesma região, quantificar o maior número possível de variáveis e, é desejável, que os biótipos sejam puros (homozigotos) e que sejam submetidos à competição com uma cultura (YU; POWLES, 2014a).

O comportamento ecofisiológico de biótipos resistentes comparado a plantas suscetíveis pode ser similar, mesmo quando houver alteração genética e enzimática

(RIZZARDI et al., 2002), mostrando a elevada capacidade de adaptação dos biótipos às mudanças ambientais através da alocação de recursos (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a). Estudos realizados em plantas de *R. raphanistrum* L. demonstraram que não houve diferenças na habilidade competitiva, na taxa de crescimento relativo e na fotossíntese, mesmo com o aumento da atividade da enzima (LI et al., 2013). No entanto, quando a resistência deve-se à maior metabolização pela citocromo P₄₅₀, a alocação de recursos entre biótipos resistentes e suscetíveis pode variar e resultar em menor competitividade de biótipos resistentes comparados a biótipos suscetíveis, devido ao menor crescimento vegetativo e menor alocação de recursos na fase reprodutiva (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b).

O diagnóstico da população de plantas daninhas resistentes e sua caracterização são imprescindíveis para propor estratégias de manejo e evitar a disseminação da resistência, pois o controle químico é uma ferramenta importante para manejo de plantas daninhas em áreas agrícolas.

A caracterização da resistência de biótipos de *Raphanus sativus* L. (nabo) a herbicidas inibidores da enzima ALS é importante para evitar sua disseminação e garantir estratégias de controle para esta planta daninha. O trabalho tem como hipóteses gerais: biótipos resistentes necessitam de doses maiores do herbicida iodosulfurom-metílico comparado ao suscetível para obter a mesma C₅₀ e a GR₅₀; biótipos resistentes são sensíveis à herbicidas com mecanismos de ação distintos indicados para o controle da espécie; biótipos resistentes apresentam maior atividade da enzima ALS e há alteração no gene da ALS quando comparado ao biótipo suscetível; os biótipos de nabo não apresentam metabolismo diferencial do herbicida e, que o biótipo resistente apresenta custos de adaptabilidade quando comparado ao suscetível.

Os objetivos do trabalho foram: avaliar a resposta de biótipos de nabo resistentes e suscetível a diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódico; avaliar o controle destes biótipos com herbicidas alternativos recomendados para o controle da espécie na cultura do trigo, milho e soja; quantificar a atividade da enzima ALS em biótipos de nabo resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico; investigar possíveis mutações no gene da ALS em biótipos suscetível e resistentes ao iodosulfurom-metílico; avaliar a resposta de biótipos de nabo à aplicação de iodosulfurom-metílico, após tratamento com inibidores do metabolismo

da citocromo P₄₅₀ monooxigenase e, identificar e comparar o valor adaptativo dos biótipos de nabo resistente e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico.

2. CAPÍTULO I – Resistência de biótipos de *Raphanus sativus* L. ao herbicida iodosulfurom-metílico e controle alternativo em trigo, milho e soja.

2.1 Introdução

O *Raphanus sativus* L. (nabo) é uma das espécies de cobertura de solo mais importantes dos sistemas agrícolas do Sul do Brasil, utilizada no período que antecede os cultivos de inverno e verão. Esta espécie de outono/inverno pertence à família Brassicaceae, possui crescimento rápido, elevada taxa de mineralização (AMADO et al., 2002), sendo considerada planta descompactadora de solos (MUZILLI, 2002) e, em função de produzir compostos alelopáticos (MALIK, 2009), é utilizada como cultura supressora de plantas daninhas (BALBINOT JUNIOR; MORAES; BACKES, 2007). Apesar da importância, o nabo pode tornar-se uma planta daninha quando presente nos cultivos de inverno (VARGAS; ROMAM, 2005). A ocorrência de plantas daninhas em áreas agrícolas resulta em perdas da produtividade (LAMEGO et al., 2004) sendo considerada a principal fonte de perda de produção das culturas (OERKE, 2006).

A presença de nabo na cultura do milho e da soja e, principalmente, em trigo constitui problema importante, pois é uma planta com elevada capacidade de competição (ESLAMI et al., 2006; RIGOLI et al., 2008; BIANCHI et al., 2011) tornando necessária a adoção de medidas de controle. Além disso, o nabo possui compostos alelopáticos que podem influenciar o desenvolvimento inicial das culturas (NORSWORTHY, 2003; SCHENEIDER; CRUZ-SILVA, 2012).

O manejo inicial do nabo é importante e, geralmente, o controle têm sido realizado com herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) (THEISEN,

2008), que constituem na principal ferramenta para controle de plantas daninhas que infestam culturas de inverno.

Estes herbicidas atuam na primeira enzima da rota de síntese dos aminoácidos de cadeia lateral valina, leucina e isoleucina, onde ocorre o bloqueio da divisão celular e da síntese de DNA, acarretando acúmulo de cetibutirato e bloqueio da síntese de Acetil-CoA (ROMAN et al., 2007). Os sintomas em plantas tratadas são caracterizados por clorose em folhas novas e necrose dos tecidos, que ocorrem entre sete e quatorze dias após a aplicação (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

A utilização desta classe herbicida deve-se à alta eficiência e seletividade, baixa dose aplicada, baixa toxicidade a mamíferos e baixo impacto ambiental (YU et al., 2003; ROMAN et al., 2007, ENDO et al., 2013). Embora seja eficaz no controle de plantas daninhas, a dependência excessiva de um único mecanismo de ação possibilitou a evolução dos casos de resistência (THEISEN, 2008; POWLES; YU, 2010; POWLES; PRESTON, 2014).

Os herbicidas inibidores da ALS foram introduzidos no mercado mundial em 1982 e, apesar do pouco tempo de uso, constitui a principal classe com problemas de resistência de plantas daninhas a herbicidas (HEAP, 2015). Biótipos resistentes têm a capacidade de sobreviver e reproduzir após submetidos a uma dose herbicida que é letal sobre a mesma população (VARGAS et al., 2009). Fatores genéticos podem colaborar fortemente no aparecimento da resistência como, a alta frequência inicial do gene, responsável por conferir a resistência, mais evidente nos casos que envolvem os herbicidas inibidores da ALS e da ACCase (Acetil coenzima-A carboxilase) quando comparados a outros mecanismos (VIDAL; FLECK, 1997). Altas frequências resultam em menor tempo para o aparecimento de biótipos resistentes que, para a ALS, é de aproximadamente quatro anos (PRESTON; POWLES, 2002). Outro fator que contribuiu para o expressivo número de espécies resistentes aos inibidores da ALS é a presença de alelos com dominância e semidominância do tipo nuclear, que possibilitam rápida dispersão devido à capacidade de fecundação via pólen (VIDAL, FLECK, 1997; VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001).

Atualmente, são relatados 449 casos de resistência, englobando 245 espécies daninhas, sendo 143 dicotiledôneas e 102 monocotiledôneas, distribuídas em 66 países e em 85 culturas agrícolas. Deste total, os herbicidas inibidores da ALS são a principal classe com casos de resistência, com 151 espécies, o que representa 62% dos casos. A predominância de espécies daninhas resistentes a

herbicidas inibidores da ALS nas diferentes culturas faz desta classe herbicida a mais problemática, principalmente em trigo, soja e milho, onde a presença de espécies daninhas resistentes a estes herbicidas são mais evidentes. Entre as espécies de grande importância e com resistência a estes herbicidas estão as pertencentes à família Brassicaceae, caso do *Raphanus sativus* L. (HEAP, 2015).

Os primeiros registros sobre a ocorrência de nabo resistente deram-se no ano de 1997, na África do Sul e na Austrália (HEAP, 2015). Atualmente, a Austrália concentra os maiores problemas com esta planta daninha, onde há biótipos com resistência múltipla a até cinco mecanismos de ação distintos. Neste país, foram diagnosticados biótipos de nabo com resistência a herbicidas inibidores de enzima ALS (HASHEM et al., 2001), a herbicidas mimetizadores de auxina, a inibidores da síntese de carotenóides e a inibidores de fotossistema II (WALSH et al., 2004; JUGULAM et al., 2013) e, mais recente, a herbicidas inibidores da enol-piruvil chiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs) (ASHWORTH et al., 2014).

No Brasil, a primeira constatação de nabo resistente, ocorreu em 2001 para os herbicidas inibidores da ALS clorimurom-etílico, cloransulam-metílico, imazetapir, metsulfurom-metílico e nicosulfurom (HEAP, 2015) seguido de imazapic + imazapir (VARGAS et al., 2010).

Na maioria dos casos, a resistência de plantas daninhas a herbicidas provoca alterações em biótipos resistentes quando comparados a biótipos suscetíveis. Entre as mudanças pode-se citar o aumento da dose necessária para controlar 50% da população (C_{50}) e reduzir 50% da produção de massa seca da parte aérea (GR_{50}) entre plantas resistentes e suscetíveis, que podem ser obtidas através das curvas de dose resposta (CHRISTOFFOLETI, 2002). A determinação destas variáveis permite o cálculo do fator de resistência (FR), que consiste no número de vezes em que a dose necessária para o controle da população resistente é maior do que a dose necessária para causar o mesmo efeito na população suscetível (HALL; STROMME; HORSMAN, 1998).

Alguns trabalhos têm demonstrado a necessidade de usar doses maiores de herbicidas inibidores de ALS para controlar biótipos de nabo (THEISEN, 2008; PANDOLFO et al., 2013; COSTA; RIZZARDI, 2014), o que pode inviabilizar muitas vezes o seu uso (MONJARDINO; PANNELL; POWLES, 2003).

Uma vez constatada a resistência, medidas de controle devem ser adotadas a fim de minimizar os efeitos negativos dos biótipos. Entre as formas de manejo

químico para biótipos resistentes a herbicidas têm-se a utilização de herbicidas com mecanismos de ação diferenciados ou a associação de herbicidas com mecanismos de ação distintos (POWLES; HOWAT, 1990), constituindo-se estas em alternativas eficazes no controle de plantas daninhas resistentes, além de evitar a seleção de novos biótipos resistentes (OLIVEIRA NETO et al., 2010). Para nabo resistente, a antecipação da dessecação e o uso de herbicidas alternativos como os inibidores de PROTOX e os mimetizadores de auxina, entre outros, são ferramentas que podem melhorar o controle desta planta daninha (THEISEN, 2008).

Diante disso, este estudo teve como hipótese que biótipos resistentes necessitam de doses maiores do herbicida iodosulfurom-metílico comparado ao suscetível para controlar 50% da população (C_{50}) e/ou reduzir em 50% a produção de massa seca da parte aérea (GR_{50}) e, que biótipos resistentes são sensíveis à herbicidas com outros mecanismos de ação indicados para o controle da espécie.

O objetivo do estudo foi avaliar a resposta de biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes e suscetível a diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico e, avaliar o controle destes biótipos com herbicidas alternativos recomendados para o controle da espécie na cultura do trigo, milho e soja.

2.2 Material e Métodos

Para a realização do trabalho foram coletadas sementes de plantas de nabo que sobreviveram à aplicação de herbicidas inibidores da ALS, em lavouras das regiões norte e noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, com o objetivo de confirmar a resistência. No total, foram coletados dezesseis biótipos (Fig. 1; tab. 1) onde as sementes contidas em cada amostra eram provenientes de uma planta. Cada amostra foi identificada e georreferenciada através das suas coordenadas geodésicas utilizando o equipamento de GPS-*Global Positioning System* (tab. 1).

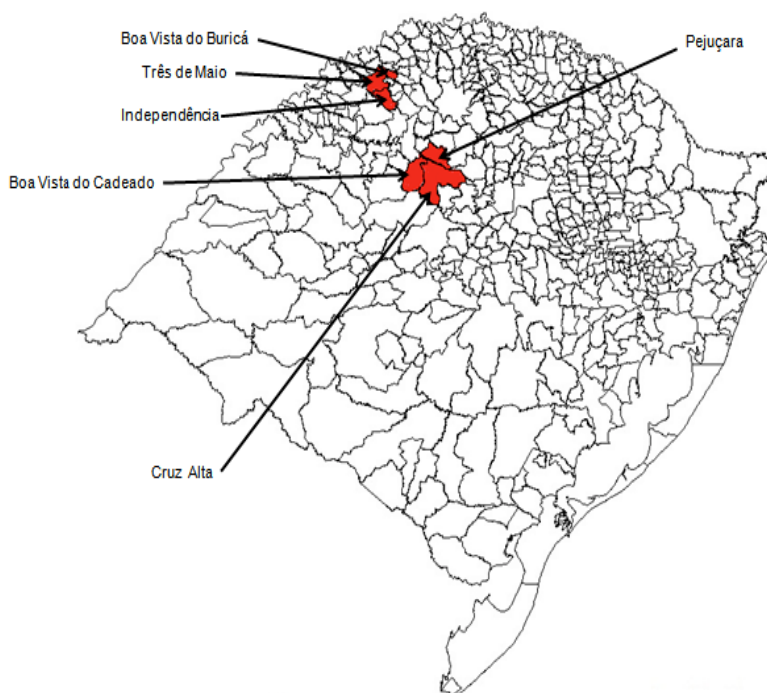


Figura 1- Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com os locais de coleta das sementes de nabo com suspeita de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Após as coletas, as sementes foram limpas e armazenadas por 180 dias até a implantação dos ensaios. Em março de 2013, as sementes dos biótipos suspeitos de resistência foram semeadas em bandejas e, após a emergência, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade volumétrica de 0,75 L, contendo solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo e substrato GerminaPlant® na proporção 2:1. A análise do solo evidenciou pH em água= 5,6; $CTC_{pH7}=7,2 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; matéria orgânica= 1,5%; argila= 16% ; textura= 4 ; Ca= $4,1 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Mg= $1,1 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Al= $1,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; P= $6,5 \text{ mg dm}^{-3}$ e K= $0,15 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. A correção da fertilidade foi realizada previamente a mistura com o substrato conforme as recomendações para a cultura do nabo forrageiro (SOCIEDADE, 2004).

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições contendo uma planta por vaso plástico, onde os biótipos coletados foram submetidos à aplicação do herbicida iodosulfurom-metílico na dose máxima de registro para controle de nabo, correspondente a $4,0 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ (AGROFIT, 2014) quando atingiram estágio vegetativo de 3-4 folhas.

A aplicação do herbicida foi realizada com pulverizador costal pressurizado a CO₂, calibrado para proporcionar volume de calda de 120 L ha⁻¹, equipado com pontas de pulverização do tipo leque 110.02, espaçadas 50 cm entre si.

A avaliação de controle foi realizada 28 dias após a aplicação do tratamento, adotando-se a escala percentual onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte completa das plantas, respectivamente (FRANS; CROWLEY, 1986).

Tabela 1- Localização e resposta de biótipos de *Raphanus sativus* em função da aplicação de 4,0 g i.a. ha⁻¹ de iodosulfurom-metílico avaliado visualmente aos 28 dias após aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Biótipos	Local	Coordenadas		Controle (%)
		Latitude	Longitude	
1*	Três de Maio	S 27°40'72"	W 54°19'39"	99
3	Três de Maio	S 27°42'40"	W 54°22'17"	2
4*	Três de Maio	S 27°44'20"	W 54°22'15"	1
6	Boa Vista do Buricá	S 27°38'69"	W 54°09'53"	4
8	Independência	S 27°57'46"	W 54°09'22"	6
10	Três de Maio	S 27°46'12"	W 54°17'16"	7
11	Independência	S 27°51'45"	W 54°16'40"	4
12	Três de Maio	S 27°47'05"	W 54°15'43"	3
13*	Boa Vista do Cadeado	S 28°48'24"	W 53°21'18"	1
14	Três de Maio	S 27°46'15"	W 54°17'23"	4
16	Independência	S 27°50'41"	W 54°17'47"	5
18	Independência	S 27°56'39"	W 54°12'25"	2
20	Três de Maio	S 27°44'22"	S 27°44'22"	12
21	Três de Maio	S 27°46'46"	W 54°18'53"	6
22	Cruz Alta	S 28°37'03"	W 53°37'10"	98
29	Pejuçara	S 28°20'50"	W 53°40'47"	2

*biótipos escolhidos: B₁= 99% de controle; B₄ e B₁₃= 1% de controle.

Neste estudo preliminar foram identificados 14 biótipos resistentes, sendo que, dois biótipos resistentes (os que apresentaram menor nível de controle) e um biótipo suscetível (o que apresentou maior sensibilidade) foram selecionados. Os biótipos selecionados foram isolados em mini-estufas para evitar a polinização cruzada, a fim de obter material para os experimentos posteriores. Cada biótipo foi classificado taxonomicamente, onde um exemplar de cada foi depositado no

Herbário PEL do Departamento de Botânica pertencente à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob os números: 26.495 (B₁), 26.496 (B₄) e 26.497 (B₁₃).

2.2.1 Curva dose resposta

A determinação da dose do herbicida iodosulfurom-metílico necessária para controlar 50% da população (C₅₀) e reduzir 50% da produção de massa seca de nabo (GR₅₀) em biótipos suscetível e resistentes foi realizada em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel utilizando o delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições. As unidades experimentais constaram de vasos plásticos, com capacidade volumétrica de 0,75 L, contendo substrato, conforme descrito no experimento preliminar. O estabelecimento dos biótipos deu-se primeiramente em bandejas onde as sementes foram semeadas e, após a emergência, foram transplantadas uma planta por vaso.

Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, onde o Fator A foi constituído dos biótipos de nabo (B₁, B₄ e B₁₃) e, o fator B de doses do herbicida iodosulfurom-metílico. Para o biótipo suscetível (B₁) utilizou-se as doses 0,0; 0,219; 0,438; 0,876; 1,75; 3,5; 7,0; 14,0 e 28,0 g i.a. ha⁻¹ e, para os biótipos resistentes (B₄ e B₁₃) foram utilizadas as doses 0,0; 1,75; 3,5; 7,0; 14,0; 28,0; 56,0; 112,0 e 224,0 g i.a. ha⁻¹ do herbicida.

A aplicação dos tratamentos foi realizada quando as plantas atingiram estágio de 3-4 folhas, com pulverizador costal pressurizado a CO₂, com ponta de pulverização do tipo leque 110.02, espaçadas a 50 cm, a pressão constante de 210 KPa, regulado para um volume de calda equivalente a 120 L ha⁻¹.

As variáveis avaliadas foram controle visual aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) aos 28 DAA. As avaliações de controle foram realizadas utilizando a escala percentual adaptada de Frans e Crowley (1986). A MMSPA foi determinada 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 ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear do tipo log-logístico utilizando o software SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012) e, os valores de C₅₀ e GR₅₀ foram calculados a partir dos parâmetros da equação (SEEFELDT et al.,

1995), a qual relaciona a resposta da planta (controle) com a dose x do herbicida. Os valores foram ajustados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico, conforme Vargas et al., (2013):

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

onde: y = percentagem 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% da resposta variável e b é a declividade da curva.

O fator de resistência (FR) foi calculado pela razão entre o C_{50} ou GR_{50} do biótipo resistente e o seu correspondente do biótipo suscetível. O intervalo de confiança foi calculado através da estimação do intervalo para a média μ com variância estimada conforme 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 GR_{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), onde a sobreposição do intervalo de confiança entre os biótipos indica não haver diferença significativa entre os valores de C_{50} e de GR_{50} dos biótipos (AVILA et al., 2005).

2.2.2 Controle alternativo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel, utilizando o delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. As unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos, com capacidade de 0,75 mL, preenchidas com substrato GerminaPlant[®], contendo uma planta de nabo por vaso. O estabelecimento dos biótipos, a aplicação dos tratamentos, o estágio de aplicação e a metodologia utilizada para avaliar cada variável foram as mesmas descritas no estudo de dose resposta.

Os tratamentos utilizados preconizaram estratégias de manejo químico considerando a operação de dessecação e o manejo da planta daninha na pós-emergência das culturas de trigo, milho e soja, levando em conta a seletividade do herbicida dentro de cada cultura, conforme consta nas tabelas 2 e 3:

Tabela 2- Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo e/ou equivalente ácido, produto comercial e dose dos herbicidas (g i.a. ha⁻¹) utilizados nos tratamentos em pré-semeadura das culturas (dessecação) para controle de biótipos de *Raphanus sativus*. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Mecanismo de ação	Grupo químico	Ing. ativo e/ou Eq. ácido	Produto Comercial	Dose
Inib. da EPSPs	Glicina substituída	Glifosato	Roundup Original [®]	720
Inib. da GS	Homoalanina substituída	Glufosinato - sal de amônio	Finale [®] 1	400
Inib. do FS II	Bipiridílio	Dicloreto de paraquate	Gramoxone [®] 2	400
Inib. do FSI + FS II	Ureia +Bipiridílio	Diurum + Dicloreto de paraquate	Gramocil [®] 3	200+400
Inib. da PROTOX	Pirimidinedionas	Saflufenacil	Heat [®] 4	49

¹foi adicionado espalhante adesivo Hoefix[®] (0,2% v/v) para o herbicida Finale[®], ^{2,3}espalhante adesivo não iônico Silwet[®] (0,1% v/v) para o herbicida Gramoxone[®] e Gramocil[®] e o ⁴adjuvante Dash[®] HC (0,5% v/v) para o herbicida Heat[®].

Tabela 3- Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas (g i.a. ha⁻¹) utilizados nos tratamentos em pós-emergência da cultura do trigo, milho e soja (seletivos) para controle de biótipos de *Raphanus sativus*. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Mecanismo de ação	Grupo químico	Ing. ativo Eq. ativo	Produto Comercial	Dose
Trigo				
Inibidores da ALS	Sulfonilureia	Metsulfurom-metílico	Ally [®]	4,0
Inibidores do FS II	Benzotiadiazinona	Bentazona	Basagran [®] 1	720
Inibidores do FS II	Triazinona	Metribuzim	Sencor [®]	144
Mim. de auxina	Ácido fenoxicarboxílico	2,4-D Amina	U-46	1005
Milho				
Inib. Sint. Carotenos	Tricetona	Mesotriona	Callisto [®] 2	192
Inib. do FS II	Triazina	Atrazina	Atrazina Nortox [®]	2500
Inib. do FS II	Benzoilciclohexanodiona	Tembotriona	Soberan [®] 3	75,6
Inib. da ALS	Sulfonilureia	Nicosulfurom	Sanson [®]	60
Soja				
Inib. da ALS	Sulfonilureia	Clorimurom-etílico	Classic [®] 4	20
Inib. da PROTOX	Difeniléteres	Fomesafem	Flex [®] 5	250
Inib. do ALS	Imidazolinona	Imazetapir	Zaphyr [®]	106
Inib. da ALS	Triazolopirimidinas	Cloransulam-metílico	Pacto [®] 6	30

¹foi adicionado adjuvante Assit[®] (1,0 L ha⁻¹) para o herbicida Basagran[®], ²adjuvante Nimbus[®] (0,5% v/v) para o herbicida Callisto[®], ^{3,4}adjuvante Aureo[®] (0,5% v/v) para o herbicida Soberan[®] e Classic[®] e o ^{5,6}espalhante adesivo não iônico Silwet[®] (0,2% v/v) para os herbicidas Flex[®] e Pacto[®].

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, os biótipos foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e entre os tratamentos herbicidas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.2.3 Resistência cruzada dos biótipos a herbicidas da ALS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPeI, utilizando o delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. As unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos, com capacidade de 0,75 mL, contendo substrato GerminaPlant[®] e uma planta de nabo por vaso. O estabelecimento dos biótipos, a aplicação dos tratamentos, o estágio de aplicação e a metodologia utilizada para cada variável foram as mesmas descritas no estudo de dose resposta.

Os tratamentos foram compostos por um herbicida de cada grupo químico dos inibidores da ALS, a exceção das sulfonilureias, levando em consideração a dose recomendada de registro de cada herbicida (tab. 4) (AGROFIT, 2014).

Tabela 4- Grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas (g i.a. ha⁻¹) utilizados nos tratamentos para confirmação da resistência cruzada em biótipos de *Raphanus sativus*. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015.

Grupo químico	Ingrediente ativo	Produto Comercial	Dose
Sulfonilureia	Metsulfurom-metílico	Ally [®]	4,0
Sulfonilureia	Iodosulfurom-metílico	Hussar ^{® 1}	3,5
Imidazolinonas	Imazetapir	Zaphyr [®]	106
Triazolopirimidinas	Cloransulam-metílico	Pacto ^{® 2}	40
Pirimidiniltiobenzoatos	Bispiribaque-sódico	Sonora ^{® 3}	50
Sulfonilaminocarboniltriasolinonas	Flucarbazona sódio	Everest ^{® 4}	21

¹foi adicionado espalhante adesivo Hoefix[®] (0,25% v/v) para o herbicida Hussar[®], ²espalhante adesivo não iônico Silwet[®] (0,2% v/v) para o herbicida Pacto[®], ³óleo mineral Iharol[®] (0,25 v/v %) para o herbicida Sonora[®] e o ⁴óleo vegetal Veget Oil[®] (0,1% v/v) para o herbicida Everest[®].

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, os biótipos foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e entre os tratamentos herbicidas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.3 Resultados e Discussão

Os resultados e discussão serão apresentados de acordo com a sequência das atividades apresentadas no material e métodos.

2.3.1 Curva dose reposta

A análise de variância indicou interação entre os fatores biótipos e doses do herbicida iodosulfurom-metílico. Os dados de controle dos biótipos de nabo suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}), proporcionados pelo herbicida iodosulfurom-metílico, ajustaram-se às curvas sigmóides em todas as épocas avaliadas, sendo que, os valores do coeficiente de determinação (R^2) variaram de 0,92 a 0,99, demonstrando ajuste satisfatório dos dados ao modelo (Fig. 2, 3 e 4). A partir das equações, calcularam-se os valores de C_{50} para os biótipos de nabo suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}).

Para o biótipo B_1 observou-se, aos 14 DAA, que a C_{50} foi de 0,17 g i.a. ha^{-1} do herbicida, enquanto que para os biótipos B_4 e B_{13} a dose foi de 36,3 e 41,0 g i.a ha^{-1} , respectivamente (Fig. 2, tab. 5).

Os valores de C_{50} indicam que os biótipos B_4 e B_{13} apresentam níveis de resistência considerados altos, com necessidade de doses do herbicida iodosulfurom-metílico no mínimo 10 vezes maior daquela registrada (3,5 g i.a. ha^{-1}) para controle do nabo. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalho realizado por Costa e Rizzardi (2014) em biótipos de *R. raphanistrum* L. resistentes ao herbicida metsulfurom-metílico que necessitaram de doses 33 vezes superior àquela indicada para controle do nabo (4,0 g i.a. ha^{-1}).

Com base na não sobreposição dos intervalos de confiança (IC) entre o biótipo suscetível (B_1) e os resistentes (B_4 e B_{13}) foi possível estabelecer o fator de resistência (FR). O valor do FR constatado, aos 14 DAA, foi de 214 e 241 para o B_4 e B_{13} , respectivamente (tab. 5), indicando que a dose necessária para promover 50% de controle em ambos os biótipos resistentes é superior a 214 vezes aquela requerida para o controle do biótipo B_1 , o que inviabiliza o uso deste herbicida no controle de nabo.

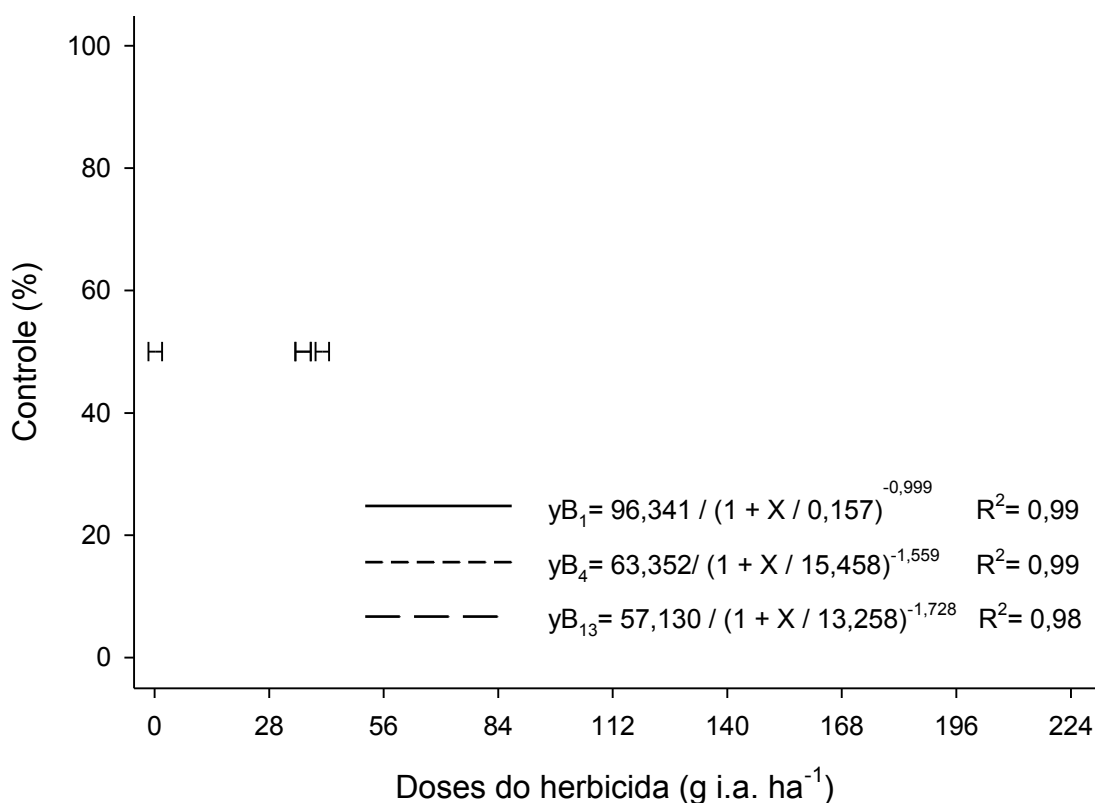


Figura 2- Controle visual (%) de biótipos de nabo, suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 14 dias após aplicação dos tratamentos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios 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 5- Valores do C_{50} com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015.

Biótipo	C_{50} ¹		Fator de resistência ² (FR)
	g i.a. ha ⁻¹	95 IC	
Suscetível (B_1)	0,17	1,82 - (-)1,48	-
Resistente (B_4)	36,30	38,17 – 34,43	214,00
Resistente (B_{13})	41,00	42,65 – 39,35	241,00

¹ C_{50} = dose necessária para obter controle de 50%.

² FR obtido pela divisão do C_{50} do biótipo resistente pelo C_{50} do biótipo suscetível.

Os resultados de controle, obtidos aos 28 DAA, demonstraram que a dose de 0,22 g i.a. ha⁻¹ do herbicida foi suficiente para controlar 50% do biótipo suscetível (fig. 3, tab. 6). Todavia, para obter o mesmo controle (C_{50}) dos biótipos B_4 e B_{13} foram necessárias doses de 19,50 e 55,50 g i.a. ha⁻¹, do herbicida iodosulfurom-metílico, respectivamente (tab. 6).

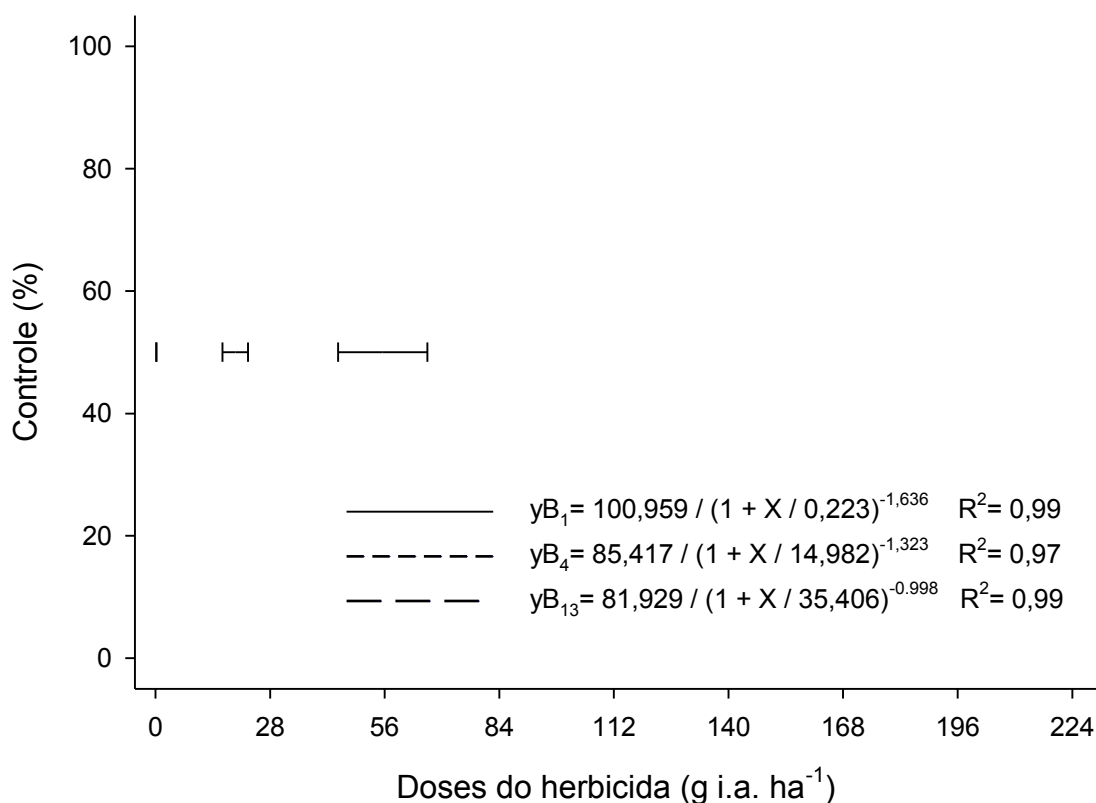


Figura 3- Controle visual (%) de biótipos de nabo, suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPeL, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios 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 6- Valores do C₅₀ com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPeL, Capão do Leão, RS, 2015.

Biótipo	C ₅₀ ¹		Fator de resistência ² (FR)
	g i.a. ha ⁻¹	95 IC	
Suscetível (B ₁)	0,22	0,24 – 0,20	-
Resistente (B ₄)	19,50	24,64 – 16,37	89,00
Resistente (B ₁₃)	55,50	66,62 – 44,38	252,00

¹ C₅₀ = dose necessária para obter controle de 50%.

² FR obtido pela divisão do C₅₀ do biótipo resistente pelo C₅₀ do biótipo suscetível.

Considerando níveis de controle superiores a 80% verificou-se para o biótipo B₁ a necessidade de doses acima de 0,51 g i.a. ha⁻¹, sendo que na dose comercial o controle obtido chegou aos 99,8%. Na comparação com os biótipos B₄ e B₁₃, percebe-se que níveis de controle superiores a 80% somente ocorrem para doses

superiores a 116 e 960 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. Estas doses herbicidas são 33 e 274 vezes superior aquela indicada, tornando inviável sua utilização para controle de nabo resistente. O fator de resistência (FR) dos biótipos B₄ e B₁₃, aos 28 DAA, foi de 89 e 252, respectivamente, indicando a necessidade de doses elevadas para obter 50% do controle de nabo resistente (tab. 6). Alto valor de FR (>500) também foi obtido para biótipos de *R. raphanistrum* L. resistentes ao herbicida sulfometurom, pertencente a classe dos inibidores da ALS (YU et al., 2012).

Os resultados da MMSPA obtidos, aos 28 DAA, demonstram que o acúmulo de MMSPA foi inversamente proporcional a dose do herbicida aplicada (Fig. 4). Para o B₁, a dose necessária de iodosulfurom-metílico para reduzir 50% da MMSPA (GR₅₀) foi de 0,11 g i.a. ha⁻¹, enquanto que para os biótipos resistentes B₄ e B₁₃ a GR₅₀ foi de 103,9 e 86,8 g i.a. ha⁻¹, evidenciando a necessidade de doses, no mínimo, 25 vezes superior aquela recomendada do herbicida para proporcionar redução de 50% da MMSPA (tab. 7).

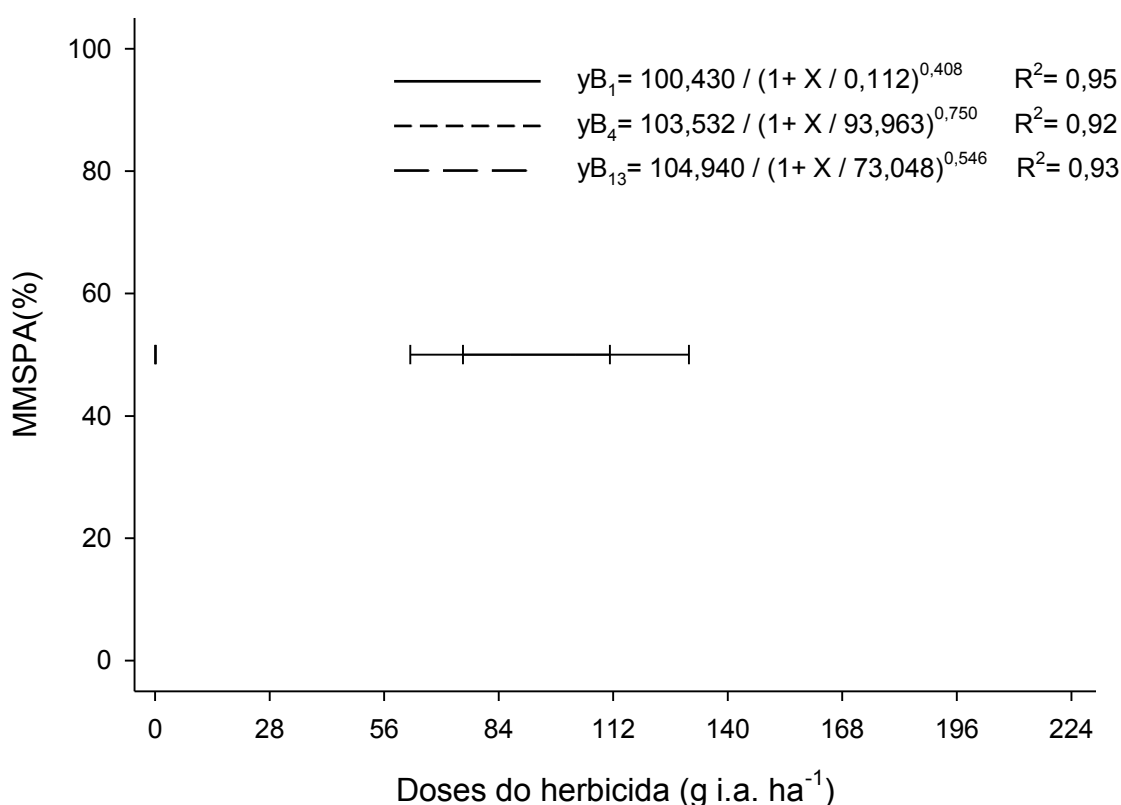


Figura 4- MMSPA (%) de biótipos de nabo, suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado aos 28 dias após aplicação do tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de redução da MMSPA da planta, com 95% de significância.

Tabela 7- Valores do GR_{50} com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) submetidos a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metílico aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos(DAA). FAEM/UFPeL, Capão do Leão, RS, 2015.

Biótipo	C_{50} ¹		Fator de resistência ² (FR)
	g i.a. ha ⁻¹	95 IC	
Suscetível (B_1)	0,11	0,19 – 0,03	-
Resistente (B_4)	102,90	130,54 – 75,26	935
Resistente (B_{13})	86,80	111,21 – 62,39	789

¹ GR_{50} = dose necessária para reduzir 50% da MMSPA da planta.

² FR obtido pela divisão do GR_{50} do biótipo resistente pelo GR_{50} do biótipo suscetível.

Níveis elevados de resistência e com FR diferentes foram encontrados em biótipos de nabo resistentes submetidos ao herbicida imazetapir e metsulfurom-metílico, sendo que o FR variou de 975 a 144, respectivamente (PANDOLFO et al., 2013).

Os resultados obtidos demonstraram que os níveis de resistência dos biótipos são elevados comparados ao biótipo suscetível. Esta situação é comum para as espécies resistentes a herbicidas inibidores da ALS e pertencentes ao grupo químico da sulfonilureias, sendo que mutação na enzima ALS pode resultar em FR elevado (HAN et al., 2012) e a necessidade de utilização de doses elevadas para controle de plantas resistentes (LAMEGO et al., 2009; BECKIE et al., 2012).

A confirmação da resistência de biótipos de *Raphanus sativus* L. ao herbicida iodosulfurom-metílico deve alertar os produtores e técnicos, pois os herbicidas registrados para controle de plantas daninhas em cereais de inverno para controle que são o iodosulfurom-metílico e o metsulfurom-metílico, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de estratégias de manejo para prevenção e para evitar a disseminação da resistência.

2.3.2 Controle alternativo

A análise de variância foi significativa para todas as variáveis analisadas, com interação entre os fatores biótipos e herbicidas para controle de *R. sativus* L. resistentes ao iodosulfurom-metílico.

O controle dos biótipos resistentes e suscetível, aos 14 DAA, foi excelente para todos os herbicidas testados na cultura do trigo, exceto para o herbicida metsulfurom-metílico, onde o controle foi de 90% no B_1 e, de 5% e 16% nos biótipos

B₄ e B₁₃, respectivamente (tab. 8). Os herbicidas glufosinato de amônio, dicloreto de paraquate, diurom+dicloreto de paraquate, glifosato e saflufenacil são consideradas opções para controle do nabo durante o manejo da dessecação realizado antes da semeadura da cultura do trigo. Resultados encontrados por Agostinetto et al., (2009) relataram controle de nabo acima de 97% com a dose de 1.440 g e.a. ha⁻¹ de glifosato corroborando com os dados deste estudo.

Tabela 8- Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA) de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do trigo. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	14 DAA						28 DAA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃		B ₁		B ₄		B ₁₃	
Gluf. de amônio	98	^{ns} A	98	A	97	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Diurom+paraquate	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Paraquate	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Glifosato	98	^{ns} A	97	A	99	A	99	^{ns} A	100	A	100	A
Saflufenacil	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Metribuzim	99	^{ns} A	99	A	99	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Bentazona	100	^{ns} A	100	A	99	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
2,4-D amina	98	^{ns} A	97	A	97	A	99	^{ns} A	100	A	100	A
Metsul. metílico	90	aB	5,0	cB	16	bB	100	aA	4,0	bB	5,0	bB
Testemunha	0,0	^{ns} C	0,0	C	0,0	C	0,0	^{ns} B	0,0	C	0,0	C
C.V. (%)	1,99						1,25					

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

Aos 28 DAA, o controle dos biótipos resistentes e suscetível foi excelente para todos os tratamentos herbicida utilizado (tab. 8). Todavia, a utilização do herbicida metsulfurom-metílico não foi eficiente no controle dos biótipos resistentes B₄ e B₁₃. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa e Rizzardi (2013) onde a aplicação de metsulfurom-metílico sobre biótipos de *R. raphanistrum* L. não possibilitou controle adequado, confirmando a resistência dos biótipos B₄ e B₁₃ à herbicidas inibidores da ALS. Na cultura do trigo, a aplicação dos herbicidas metribuzim, bentazona e 2,4-D amina proporcionaram controle igual ou superior aos 99%, aos 28 DAA, sendo opções para manejo do nabo (tab. 8). Por serem herbicidas seletivos à cultura do trigo, permitem o controle adequado do nabo mesmo com a cultura implantada. A utilização do herbicida 2,4-D amina pode ser uma opção de manejo onde seu uso resultou num controle de 100% dos biótipos resistentes, corroborando

com os resultados de Farinelli, Penarol e Lemos (2005) onde a utilização deste herbicida proporcionou controle ótimo na dose 670 g e.a. ha⁻¹.

O acúmulo de MMSPA em biótipos de *R. sativus* L. resistentes e suscetível foi menor em todos os tratamentos herbicida onde proporcionaram redução superior a 80% da MMSPA em todos os biótipos testados (tab. 9). Todavia, a aplicação de metsulfurom-metílico não resultou em redução de MMSPA em B₄ e acarretou em 21% de redução em B₁₃, possivelmente relacionado a diferenças de sensibilidade dos biótipos. Resultados obtidos por Costa e Rizzardi (2013) reportaram pequena redução da MMSPA em biótipo resistente de *R. raphanistrum* L. com o herbicida metsulfurom-metílico, não sendo considerada uma opção para manejo de biótipos resistentes. Para Costa e Rizzardi (2013), a aplicação do herbicida glifosato, na dose de 960 g e.a. ha⁻¹, proporcionou forte redução na MMSPA sendo considerada opção para manejo de nabo resistente. A aplicação dos herbicidas metribuzim, bentazona e 2,4-D amina acarretaram em redução superior a 70% da MMSPA em biótipos resistentes (tab. 9) sendo consideradas opções para manejo na cultura do trigo.

Tabela 9- MMSPA (g planta⁻¹) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do trigo. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	MMSPA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Glufosinato de amônio	0,19	^{ns} BC	0,25	C	0,26	C
Diuron+paraquate	0,15	^{ns} C	0,17	C	0,25	C
Paraquate	0,18	^{ns} BC	0,20	C	0,24	C
Glifosato	0,19	bBC	0,25	bC	0,33	aC
Saflufenacil	0,18	bBC	0,24	bC	0,30	aC
Metribuzim	0,19	bBC	0,29	aC	0,32	aC
Bentazona	0,17	bBC	0,23	bC	0,52	aB
2,4-D amina	0,20	bBC	0,32	aC	0,37	aC
Metsulfurom-metílico	0,31	cBC	2,34	aA	1,58	bA
Testemunha	1,01	^{ns} A	1,69	B	1,76	A
C.V. (%)	26,70					

*médias seguida de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

A análise de variância foi significativa para todas as variáveis analisadas, com interação entre os fatores biótipos e herbicidas para controle de *R. sativus* L. resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico na cultura do milho. Os herbicidas glufosinato de amônia, dicloreto de paraquate, diuron+dicloreto de

paraquate, glifosato e saflufenacil são opções para controle de nabo durante a dessecação (tab. 10) com níveis de controle superiores aos 98% aos 14 DAA. Devido à tecnologia existente, o herbicida glifosato pode ser utilizado para controle do nabo também na pós emergência do milho Roundup Ready® (BOHM et al., 2011). Resultados de Vitorino et al., (2014) em biótipos de *R. raphanistrum* L. demonstraram que a aplicação do glifosato na dessecação, na dose de 720 g e.a. ha⁻¹, proporcionou 98% de controle corroborando com resultados obtidos deste estudo.

Tabela 10- Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA) de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do milho. FAEM/UFPEL, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	14 DAA						28 DAA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃		B ₁		B ₄		B ₁₃	
Gluf. de amônio	99	^{ns} A	99	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Diuron+paraquate	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Paraquate	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Glifosato	98	^{ns} AB	100	A	99	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Saflufenacil	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Mesotriona	96	^{ns} B	94	B	95	B	100	^{ns} A	100	A	100	A
Tembotriona	94	aB	89	bC	90	bC	100	^{ns} A	100	A	100	A
Atrazina	95	bB	99	aA	99	aA	99	^{ns} A	100	A	100	A
Nicosulfurom	91	aC	1,0	bD	6,0	bD	100	aA	0,0	bB	2,0	bB
Testemunha	0,0	^{ns} D	0,0	D	0,0	E	0,0	^{ns} B	0,0	B	0,0	B
C.V. (%)	2,71						0,82					

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

Aos 28 DAA, o controle de nabo resistente foi considerado excelente para todos herbicidas com herbicidas indicados para a cultura do milho, exceto para o herbicida nicosulfurom onde o controle foi inferior a 2% (tab. 10). Os herbicidas mesotriona, tembotriona e atrazina, todos seletivos a cultura do milho, proporcionaram controle superior a 99% em todos os biótipos demonstrando serem alternativas excelentes. Entretanto, a aplicação do herbicida nicosulfurom não controlou os biótipos resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico (tab. 10). Em trabalho conduzido por Costa e Rizzardi (2013) a aplicação de 22,5 g i.a. ha⁻¹ de nicosulfurom em *R. raphanistrum* L. resistente acarretou em controle de apenas 24% quando comparado ao biótipo suscetível. Resultados similares foram encontrados por Michelin et al. (2012) onde a aplicação do herbicida nicosulfurom proporcionou controle inferior a 10% em biótipos de *R. sativus* L. resistentes. Entretanto, a utilização

de herbicidas com mecanismos de ação alternativos na cultura do milho constitui uma estratégia altamente eficaz no controle de biótipos resistentes (VARGAS et al., 2010; VENCILL et al., 2012).

Os resultados de acúmulo de MMSPA aos 28 DAA demonstraram que houve redução da MMSPA em biótipos resistentes e suscetível com herbicidas indicados para a cultura do milho, exceto para o herbicida nicosulfurom aplicado sobre biótipos resistentes onde o controle foi de 79% em B₄ e 82% em B₁₃ (tab. 11). O herbicida nicosulfurom, por apresentar baixo nível de controle não proporcionou reduções no acúmulo de MMSPA em ambos os biótipos resistentes (tab. 11). Em trabalho conduzido por Costa e Rizzardi (2013) a aplicação de 22,5 g i.a. ha⁻¹ de nicosulfurom em biótipos de *R. raphanistrum* L. resistente acarretou em redução de 35% quando comparado ao biótipo suscetível. No entanto, os demais herbicidas utilizados, por apresentarem mecanismo de ação distinto, são consideradas opções para manejo de nabo na cultura do milho (tab. 11).

Tabela 11- MMSPA (g planta⁻¹) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura do milho. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	MMSPA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Glufosinato de amônio	0,20	^{ns} B	0,25	B	0,26	B
Diuron+paraquate	0,18	^{ns} B	0,18	B	0,24	B
Paraquate	0,18	^{ns} B	0,18	B	0,25	B
Glifosato	0,19	bB	0,25	aB	0,33	aB
Saflufenacil	0,16	bB	0,24	aB	0,30	aB
Mesotriona	0,25	^{ns} B	0,30	B	0,29	B
Tembotriona	0,18	bB	0,29	aB	0,32	aB
Atrazina	0,25	bB	0,34	aB	0,29	aB
Nicosulfurom	0,24	bB	1,64	aA	1,55	aA
Testemunha	1,12	^{ns} A	1,45	A	1,76	A
C.V. (%)	30,60					

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

A análise de variância demonstrou que houve interação entre os fatores biótipos e herbicidas para controle de *R. sativus* L. suscetível e resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico na cultura da soja.

Os herbicidas glufosinato de amônia, dicloreto de paraquate, diuron+dicloreto de paraquate, glifosato e saflufenacil usados para manejo de

dessecação são opções para controle de nabo (tab. 12) com níveis de controle superiores aos 98% aos 14 DAA. Em trabalho conduzido por Costa e Rizzardi (2013) a aplicação de 960 g e.a. ha⁻¹ de glifosato em biótipos de *R. raphanistrum* L. proporcionou controle de 98% aos 14 DAA tanto em biótipos resistente e suscetível. Além disso, o herbicida glifosato pode ser utilizado para controle do nabo também na pós emergência da soja Roundup Ready® devido à tecnologia existente que permite seletividade à cultura (BOHM et al., 2011).

Tabela 12- Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA) de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura da soja. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	14 DAA						28 DAA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃		B ₁		B ₄		B ₁₃	
Gluf. de amônio	99	^{ns} A	99	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Diuron+paraquate	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Paraquate	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Glifosato	98	^{ns} A	100	A	99	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Saflufenacil	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Clorimurrom	64	aC	15	bC	20	bC	99	aA	20	bC	25	bC
Fomesafem	100	^{ns} A	100	A	100	A	100	^{ns} A	100	A	100	A
Imazetapir	66	aC	12	bC	8,0	bC	100	aA	2,0	bD	0,0	bD
Cloransulam	91	aB	60	bB	56	bB	100	aA	58	cB	74	bB
Testemunha	0,0	^{ns} D	0,0	D	0,0	D	0,0	^{ns} B	0,0	D	0,0	D
C.V. (%)	2,93						2,37					

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

O controle dos biótipos de nabo aos 28 DAA foi acima de 99% para todos os tratamentos herbicidas, exceto para biótipos resistentes tratados com herbicidas inibidores da enzima ALS (tab.12). O único herbicida seletivo utilizado que controlou biótipos de nabo resistente foi o fomesafem (tab. 12). Resultados semelhantes foram obtidos por Michelin et al. (2012) em aplicações com o herbicida lactofem na dose de 240 g i.a. ha⁻¹ sobre biótipos de nabo suscetível e resistente ao metsulfurom-metílico. Entre os herbicidas inibidores da ALS seletivos à cultura constataram-se diferenças entre os níveis de controle, sendo mais evidenciado na aplicação com o cloransulam-metílico. A aplicação deste herbicida proporcionou controle de 58 e 74% nos biótipos B₄ e B₁₃, respectivamente. Esses resultados corroboram com os obtidos por Costa e Rizzardi (2013) onde o herbicida cloransulam-metílico proporcionou controle de 54% no biótipo resistente de *R. raphanistrum* L. quando

comparado ao suscetível e, a aplicação de imazetapir e de clorimurom-etílico não controlou os biótipos resistentes. Em trabalho realizado por Yu et al. (2012) relataram que a aplicação de herbicidas inibidores da enzima ALS, como o clorsulfurom, imazamox e metosulam, em biótipos resistentes de *R. raphanistrum* L. não proporcionaram controle eficiente.

Considerando a redução da MMSPA aos 28 DAA, todos os herbicidas cujo mecanismo de ação não é inibição da ALS, possibilitaram menor acúmulo de massa seca em biótipos resistentes (B₄ e B₁₃) (Tab. 13). Entretanto, todos os herbicidas proporcionaram redução da MMSPA no biótipo suscetível (B₁).

Tabela 13- MMSPA (g planta⁻¹) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico com herbicidas alternativos para manejo na cultura da soja. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	MMSPA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Glufosinato de amônio	0,20	^{ns} B	0,25	C	0,26	C
Diuron+paraquate	0,18	^{ns} B	0,18	C	0,24	C
Paraquate	0,18	^{ns} B	0,18	C	0,25	C
Glifosato	0,19	bB	0,25	aC	0,33	aC
Saflufenacil	0,16	bB	0,24	aC	0,30	aC
Clorimurom-etílico	0,29	bB	1,47	aA	1,43	aA
Fomesafem	0,17	bB	0,40	aC	0,28	aC
Imazetapir	0,24	bB	1,51	aA	1,42	aA
Cloransulam-metílico	0,29	bB	0,80	aB	0,66	aB
Testemunha	1,12	^{ns} A	1,45	A	1,76	A
C.V. (%)	30,60					

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

Dos herbicidas seletivos indicados para a cultura da soja, as maiores reduções foram verificadas para o herbicida fomesafem. Por ser de um mecanismo de ação distinto proporcionou 72 e 84% de redução nos biótipos B₄ e B₁₃, respectivamente. Situação similar foi verificada com a aplicação de diferentes herbicidas da ALS para controle de biótipos resistentes de *R. raphanistrum* L. onde nenhum dos herbicidas proporcionou controle adequado (COSTA; RIZZARDI, 2013).

A aplicação de herbicidas inibidores da enzima ALS de três diferentes grupos químicos não controlaram satisfatoriamente biótipos de *R. sativus* L. resistentes, sugerindo que estes biótipos apresentam resistência cruzada, situação evidenciada por Theisen (2008) em *R. sativus* L. e por Costa e Rizzardi (2013) em *R.*

raphanistrum L.. Todavia, herbicidas de mecanismos distintos são considerados alternativas eficazes no controle de biótipos resistentes (VENCILL et al., 2012).

2.3.3 Resistência cruzada dos biótipos a herbicidas da ALS

A análise de variância indicou interação entre os fatores biótipos e os herbicidas. Na avaliação realizada, aos 14 DAA, observou-se que o herbicida bispiribaque-sódico apresentou o maior nível de controle dos biótipos resistentes e do suscetível. Entretanto, observa-se que para os biótipos resistentes B₄ e B₁₃ os níveis de controle foram inferiores a 50% (tab. 14).

Tabela 14- Controle (%) de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico submetidos aos diferentes grupos químicos avaliados aos 14 dias após aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	14 DAA						28 DAA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃		B ₁		B ₄		B ₁₃	
Metsulfurom	59	aC	9,0	bC	11	bD	99	aA	2,0	bCD	2,0	bC
Iodosulfurom	53	aC	17	bB	19	BC	99	aA	1,0	bCD	4,0	cB
Flucarbazona	52	aC	15	bB	13	bCD	98	aA	0,0	bD	4,0	bB
Imazetapir	76	aB	15	bB	20	BC	98	aA	3,0	bC	2,0	bC
Bispiribaque	88	aA	48	bA	41	BA	99	aA	78	bA	68	cA
Cloransulam	77	aB	22	bB	28	BB	99	aA	10	bB	11	bB
Testemunha	0,0	^{ns} D	0,0	D	0,0	E	0,0	^{ns} B	0,0	D	0,0	D
C.V. (%)	14,34						7,00					

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns} = não significativo ($p \leq 0,05$).

Observou-se ainda, que os biótipos resistentes apresentaram resposta diferenciada aos herbicidas inibidores da ALS, e isso pode estar relacionado com a afinidade da molécula herbicida com a enzima alvo. Alguns autores relataram que biótipos resistentes a herbicidas, do grupo químico das sulfonilureias, devido a mutação no local de ação, apresentam níveis variáveis de resistência cruzada (HALL; DEVINE, 1990; SAARI; COTTERMAN; PRIMIANI, 1990; SAARI; COTTERMAN; THILL, 1994; WALSH et al., 2004).

O nível de controle do biótipo suscetível, aos 28 DAA foi igual ou superior a 98% para todos os herbicidas avaliados. Entretanto, para os biótipos resistentes, o controle foi inferior a 11%, exceto para o herbicida bispiribaque-sódico que proporcionou controle de 78 e 68% para os biótipos B₄ e B₁₃, respectivamente (tab.

14). Diferentes níveis de controle foram constatados por Schmitzer et al. (1993) em biótipos de *Xanthium strumarium* L. resistentes a herbicidas inibidores da ALS, tratados com herbicidas de grupos distintos onde biótipos eram menos sensíveis ao imazaquim (imidazolinona) quando comparado aos herbicidas clorimurrom-etílico (sulfonilureia) e o flumetsulam (triazolopirimidina).

Em relação à MMSPA acumulada pelos biótipos, observou-se que a aplicação dos herbicidas na dose recomendada reduziu, em média, 70% da MMSPA do B₁ (tab. 15). Esta situação não foi observada nos biótipos B₄ e B₁₃ em resposta à aplicação de diferentes herbicidas dos inibidores da enzima ALS, onde apenas para o B₁₃ houve redução média da MMSPA em 8% (tab. 15).

Tabela 15- Controle (%) e MMSPA (g) de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico submetidos aos diferentes grupos químicos da ALS avaliado aos 28 dias após aplicação dos tratamentos (DAA). FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	MMSPA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Metsulfurom-metílico	0,50	bB	1,31	aAB	1,41	aBC
Iodosulfurom-metílico	0,43	bB	1,41	aAB	1,51	aAB
Flucarbazona sódio	0,44	bB	1,37	aAB	1,82	aA
Imazetapir	0,38	bB	1,59	aA	1,40	aBC
Bispiribaque-sódico	0,42	bB	0,75	aC	0,58	abD
Cloransulam-metílico	0,43	bB	1,22	aB	1,06	bC
Testemunha	1,42	^{ns} A	1,15	B	1,42	BC
C.V. (%)	14,63					

*médias seguida de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns}= não significativo ($p \leq 0,05$).

Para os biótipos resistentes, o único herbicida que provocou redução da MMSPA foi o bispiribaque-sódico (tab. 15). Esse tratamento proporcionou o maior controle (tab. 14) onde a redução da MMSPA nos biótipos B₄ e B₁₃ foram de 35 e 60%, respectivamente, quando comparados com as suas respectivas testemunhas. Costa e Rizzardi (2013) evidenciaram reduções no acúmulo de MMSPA distintos entre herbicidas da ALS aplicados em biótipos resistentes de *R. raphanistrum* L.. Para o herbicida cloransulam-metílico houve redução de 61% enquanto que o acúmulo de MMSPA em biótipos tratados com metsulfurom-metílico e imazetapir não diferiram entre si quando comparados com a testemunha sem aplicação.

Os resultados demonstraram que biótipos de *R. sativus* L. apresentam resistência cruzada, ou seja, biótipos resistentes a dois ou mais herbicidas devido a um só mecanismo de ação (VARGAS et al., 2009). Este tipo de resistência, por envolver diferentes herbicidas de um mesmo mecanismo de ação, pode reduzir e dificultar as opções para controle de *R. sativus* L., situação evidenciada em biótipos de *R. raphanistrum* L. resistentes a herbicidas inibidores da enzima ALS (YU et al., 2012).

2.4 Conclusões

Os biótipos de *R. sativus* L. B₁ é suscetível enquanto os biótipos B₄ e B₁₃ são resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico, apresentando C₅₀ de 19,5 e 55,5 g i.a. ha⁻¹ e, GR₅₀ 102,9 e 86,8 respectivamente, aos 28 DAA.

Todos os herbicidas aplicados controlaram o biótipo suscetível e os biótipos resistentes, exceto os herbicidas metsulfurom-metílico, nicosulfurom, clorimurom-etílico, imazetapir e cloransulam-metílico (todos pertencentes à classe dos inibidores da enzima ALS) aplicados sobre os biótipos resistentes B₄ e B₁₃, sendo necessário utilizar herbicidas com mecanismo de ação distinto.

Os biótipos de nabo B₄ e B₁₃ apresentam resistência cruzada a herbicidas inibidores da enzima ALS, apresentando maior suscetibilidade ao herbicida bispiribaque-sódico do grupo químico das pirimidiniltiobenzoatos.

3. CAPÍTULO II – Alterações na enzima acetolactato sintase e o mecanismo envolvido na resistência de biótipos de *Raphanus sativus* L. ao herbicida iodosulfurom-metílico.

3.1 Introdução

O *Raphanus sativus* L. (nabo) é uma espécie daninha presente nos cultivos de inverno do Sul do Brasil causando sérios prejuízos quando não controlada nas culturas (VARGAS; ROMAN, 2005; ESLAMI et al., 2006; RIGOLI et al., 2008). O uso de herbicidas é uma prática importante em áreas de produção para controlar de forma eficiente esta e outras plantas daninhas.

Com mais de 30% dos herbicidas registrados para uso na agricultura no mundo (MCCOURT et al., 2006), os herbicidas inibidores da enzima ALS são essenciais para controle de diversas plantas daninhas em muitas culturas, pois são seletivos, requerem baixas doses de aplicação por área e, alguns, apresentam baixa toxicidade aos animais (TAN; EVANS; SINGH, 2006; ENDO et al., 2013).

Os herbicidas inibidores da ALS possuem cinco estruturas químicas distintas, com alto potencial na inibição da enzima ALS (SHANER; ANDERSON; STIDHAM, 1984; PONTZEN, 2002; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010), incluindo os grupos químicos das sulfonilureias, imidazolinonas, pirimidiniltiobenzoatos, triazolopirimidinas e sulfonilaminocarboniltiazolinonas e (SENSEMAN, 2007), sendo os quatros primeiros grupos comercializados no Brasil (CARVALHO, 2013). Eles interferem na biossíntese dos aminoácidos de cadeia alifática valina, leucina e isoleucina. A enzima ALS é responsável por catalisar a condensação de duas moléculas de piruvato para formar acetolactato (precursor de valina e leucina) e por condensar o piruvato e cetobutirato para formar aceto-hidroxitobutirato (precursor de

isoleucina) (SINGH; SHANER, 1995; TRANEL; WRIGHT, 2002; ROMAN et al., 2007; DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008).

Em áreas de inverno, cultivadas com trigo e cevada, o controle do nabo é realizado essencialmente com uso de herbicidas inibidores da ALS, como o iodosulfurom-metílico e o metsulfurom-metílico, fato que pode ter favorecido a seleção de biótipos resistentes a estes herbicidas (THEISEN, 2008). Detectada a resistência, a elucidação do mecanismo envolvido é importante, pois permite determinar alternativas de manejo que possibilitem diminuir a pressão de seleção.

Os mecanismos que conferem resistência a herbicidas são agrupados em duas categorias: a primeira envolve o local de ação do herbicida, como exemplo mutações no DNA alteram o local de acoplamento do herbicida na enzima e, a segunda categoria, a resistência se deve a outros mecanismos, não relacionados ao local de ação do herbicida (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007), como exemplo a metabolização e a compartimentalização das moléculas herbicida.

Ambos os mecanismos afetam a eficácia do herbicida estando relacionados ao grupo químico e ao modo de ação de cada herbicida (DÉYLE, 2013b). Entretanto, é necessário examinar ambos os mecanismos considerando a possibilidade de coexistência (AHMAD-HAMDANI et al., 2013). Esta situação foi constatada em biótipos de *Sagittaria trifolia* L. resistentes a herbicidas inibidores da enzima ALS do grupo químico das sulfonilureias (IWAKAMI et al., 2014a)

Na maioria dos casos, plantas daninhas resistentes a herbicidas inibidores da enzima ALS apresentam mutação do gene que codifica esta enzima, resultando redução da sensibilidade desta aos herbicidas (TRANEL; WRIGHT, 2002; TAN, MEDD, 2002; WARWICK; SAUDER; BECKIE, 2005; CHRISTOFFERS et al., 2006; TRUCCO et al., 2006; POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2012).

O mecanismo molecular envolvido na resistência pelo local de ação é fácil de analisar, uma vez que envolve enzimas específicas as quais são alvo do herbicida em questão (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007). A identificação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em plantas daninhas pode ser determinada pela atividade da enzima ALS, através do acúmulo de acetoína na presença e ausência da molécula herbicida inibidora da enzima, onde apenas biótipos resistentes acumulam acetoína (GERWICK; MIRELES; EILERS, 1993). Entretanto, a maior parte dos estudos demonstram 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).

Alguns estudos sugerem que a localização do ponto de mutação no gene e a substituição específica de um aminoácido na enzima podem afetar a estrutura e a função da ALS, reduzindo sua atividade (EBERLIEN et al; 1997; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013). Para Lamego et al. (2009) e Han et al. (2012) uma simples alteração de nucleotídeos do gene pode causar mudança na estrutura da enzima alvo e reduzir a habilidade do herbicida em interagir com o sítio de ação.

Em populações de nabo resistente aos herbicidas inibidores da ALS diversos pontos de mutação no gene, que altera o local de ação, têm sido identificados (YU et al., 2003; POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2012; YU et al., 2012). Entre eles, já foram identificadas mutações na Pro₁₉₇, Asp₃₇₆ e Trp₅₇₄, sendo a alteração da Ala₁₂₂ menos comum, devido à necessidade de duas alterações de nucleotídeos enquanto as demais exigem apenas uma alteração nucleotídica (YU et al., 2003; YU et al., 2012). No entanto, a alteração gênica em vários pontos pode reduzir as opções de controle de plantas daninhas com herbicidas inibidores da ALS (YU et al., 2012).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas envolvendo outros mecanismos e, não o local de ação, resulta em menor quantidade de herbicida que chega ao local de ação e, geralmente, ocorre por redução da absorção ou translocação do herbicida, devido ao sequestro ou a metabolização de moléculas do herbicida (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007; POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2014). Plantas resistentes a herbicidas que apresentam este mecanismo tendem a acelerar a degradação do herbicida por meio do aumento da atividade da glutathione-S-transferase, da citocromo P₄₅₀ ou da glicosil-transferase (DÉLYE, 2013a).

A capacidade de metabolização de uma planta daninha permite a sua sobrevivência fazendo com que o herbicida não chegue ao seu local de ação. Essa condição pode ser induzida quando se utiliza doses abaixo da recomendada onde, plantas tratadas codificam genes que são selecionados a baixas doses de um herbicida e, potencializados em espécies que apresentam fecundação cruzada resultando em altos níveis de resistência dentro de algumas gerações (YU; POWLES, 2014). Resultados obtidos por Iwakami et al. (2014b) em biótipos de *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) resistentes a ALS revelaram que a superexpressão de

dois genes da citocromo P₄₅₀ conferiram resistência a duas classes de herbicidas inibidores da ALS (sulfonilureias e triazolopirimidinas).

O conhecimento do mecanismo envolvido em biótipos de nabo resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico é importante para propor e indicar práticas de manejo integrado para esta planta daninha.

As hipóteses desse trabalho foram que biótipos resistentes apresentam maior atividade da enzima ALS e, há alteração no gene da ALS quando comparado ao biótipo suscetível; biótipos resistentes de nabo não apresentam metabolismo diferencial ao herbicida através do complexo da P₄₅₀ monooxigenase. Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho quantificar a atividade da enzima ALS em biótipos de nabo resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico; investigar possíveis mutações no gene da ALS em biótipos suscetível e resistentes ao iodosulfurom-metílico e; avaliar a resposta de biótipos de nabo à aplicação de iodosulfurom-metílico, após tratamento com inibidores do metabolismo da citocromo P₄₅₀ monooxigenase.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Atividade enzimática

As sementes dos biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico foram semeadas em maio de 2013, em vasos plásticos com capacidade para 0,75 L, preenchidos com substrato + solo, conforme descrito no capítulo I. As plantas cresceram em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel por um período de 40 dias e, após, foram levadas até o laboratório de Plantas Daninhas da Embrapa Trigo, onde foi procedida extração e o ensaio enzimático.

3.2.1.1 Extração da enzima

O método de extração enzimática seguiu a metodologia descrita por Singh; Stidham e Shaner (1988) com modificações, onde cada amostra de material vegetal foi composta de folhas novas completamente expandidas das plantas. Foram utilizados 7 g de material vegetal (folhas) que foram congelados em nitrogênio

líquido (N_2) e macerados em almofariz até formar pó fino. Após, ao material macerado foi acrescido 70 mL (1:10 p/v) do tampão de extração fosfato 100 mM, pH 7,5, a 4°C, contendo: 0,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 10 mM de piruvato de sódio; 0,5 mM de tiamina pirofosfato (TPP); 10 μ M de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); 10% v/v de glicerol; 1mM de ditioneitol e 5% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Posteriormente, o material foi homogeneizado lentamente e mantido sob agitação por 20 minutos a 4°C em banho de gelo, sendo posteriormente a mistura filtrada com gaze em quatro camadas para remoção e descarte dos resíduos sólidos. A fração líquida foi centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi reservado para uso posterior e o resíduo sólido foi descartado.

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

O experimento foi realizado em delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições. O bioensaio *in vitro* foi realizado seguindo a metodologia proposta por Gerwick, Mireles e Eilers (1993) com algumas modificações. O bioensaio foi realizado em tubos de ensaio, sendo os tratamentos arranjados em esquema fatorial onde o fator A foi composto da solução enzimática dos diferentes biótipos (B_1 - suscetível; B_4 e B_{13} - resistentes) onde cada tubo recebeu 600 μ L desta solução (enzima) e, o fator B foi composto de diferentes concentrações do herbicida iodosulfurom-metílico (0; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 10; 50; 100 e 500 μ M) sendo acrescidos de 100 μ L da solução herbicida por tubo de ensaio. Cada tubo recebeu ainda 300 μ L do tampão de reação fosfato 80 μ M, pH=7,0, contendo 20mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 200mM de piruvato, 2mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20 μ M de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) totalizando 1000 μ L (volume final da reação). O bioensaio conteve dois tratamentos padrão sem herbicida: o primeiro denominado 0 (zero) e o segundo com 100% (cem) de atividade, sendo que o primeiro recebeu 50 μ L de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3M no início do bioensaio para impedir a atividade da enzima e, o segundo, considerado o tratamento padrão, correspondendo à testemunha sem inibidor, foi adicionado 100 μ L de água milli-Q. Os valores de absorbância desse tratamento foram descontados dos valores das leituras dos demais tratamentos com herbicida ou inibidor enzimático.

Após o preparo da reação nos tubos de ensaio, foi iniciado o primeiro período de incubação, por 60 minutos a 30°C. A reação foi interrompida com adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 3M em cada tubo de ensaio, exceto no controle zero em que a reação já havia sido interrompida inicialmente. 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.

Para a formação do complexo colorido, foram adicionados 1000 µL de solução de creatina a 0,5% p/v e 1000 µL de 1-naphtol a 5% p/v, preparado em hidróxido de sódio (NaOH) 2,5M no momento do uso. A reação foi novamente incubada por 15 minutos a 60°C, para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorbância lida em espectrofotômetro a 530 nm.

Os valores referentes à atividade da enzima ALS foram apresentados por quantidade de acetoína produzida (µmol min⁻¹ mL⁻¹), determinado pela curva padrão.

A determinação da curva padrão de acetoína foi realizada em tubos de ensaio com três repetições. Cada tubo conteve 1000 µL de solução de acetoína nas concentrações de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 e 400 µM. Para a formação do complexo colorido foi adicionado em cada tubo 1000 µL de solução de creatina 0,5% p/v e 1000 µL de 1-naphtol 5% p/v, preparado em hidróxido de sódio (NaOH) 2,5 M no momento do uso. Após o preparo da reação, a mistura foi incubada por 15 minutos a 60°C, para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorbância lida em espectrofotômetro a 530 nm.

Adicionalmente, foram calculados os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ que informam a afinidade da enzima com o substrato. Para a obtenção do K_M e do $V_{m\acute{a}x}$, foi realizado um ensaio com dez diferentes concentrações do substrato (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 100 mM) em todos os biótipos (B₁, B₄ e B₁₃). Essas concentrações do substrato foram obtidas através da mistura do tampão de reação fosfato 80 µM, pH 7,0, com a solução original de piruvato a 100 mM. O primeiro foi composto por 20 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 2 mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20 µM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e, a solução padrão foi composta por 100 mL do tampão de reação com 100 mM de piruvato.

Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados a partir da equação de Michaelis Menten ($p \leq 0,05$) (NELSON; COX, 2006), conforme segue, utilizando o software SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012).

$$y = V_{\text{máx}} * X / K_M + X$$

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

Os valores de absorbância foram corrigidos subtraindo-se o valor do controle zero. A partir deles, foi calculado o I_{50} , que 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), conforme descrito abaixo, utilizando o software SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012).

$$y = a / [1 + (x / x_{I50})]^b$$

onde: y = atividade da enzima ALS (%); a= assíntota de máxima; x= dose do herbicida iodosulfurom-metílico (μM); x_{I50} = dose do herbicida iodosulfurom-metílico sódio (μM) correspondente a 50% da inibição da enzima ALS e b= declividade da curva. Através destes resultados, foi determinado o fator de resistência (FR), calculado pela divisão do I_{50} do biótipo resistente pelo valor correspondente do biótipo suscetível, que expressa o número de vezes a dose necessária para inibir 50% da atividade da enzima do biótipo resistente comparado ao mesmo efeito no biótipo suscetível (HALL; STROMME; HORSMAN, 1998).

Nos biótipos, ainda foram analisados os teores de proteínas totais através da metodologia proposta por Bradford (1976). Após o preparo das amostras, foi realizada a leitura em espectrômetro a 595nm onde o teor de proteína de cada biótipo foi interpolado com a curva padrão de proteína.

3.2.2 Sequenciamento da enzima ALS

Para verificar alterações na sequência de aminoácidos do gene que codifica a enzima ALS foi realizado experimento em laboratório pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas utilizando três repetições, seguindo o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), adaptado da metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987).

Para isso, foram utilizadas 100 mg de folhas sem o pecíolo de biótipos de nabo resistentes (B₄ e B₁₃) e suscetível (B₁) que foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂), maceradas até pó fino em almofariz e acondicionadas em microtubos previamente resfriados, visando extrair o RNA. Ao material foi adicionado 500 µL de tampão de extração (reagente Kit PureLink™ Plant RNA) contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,7 M de cloreto de sódio (NaCl), 1% (m/v) de brometo de cetiltrimetilamônio, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol incubados por 20 minutos a 56°C. Os extratos aquosos foram extraídos duas vezes com volume igual de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os ácidos nucleicos totais foram precipitados a partir do sobrenadante através da adição de um volume igual de isopropanol gelado. Após isso, os sedimentos dos ácidos nucleicos foram resuspensores em 200 µL de extração tampão (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; 1mM de EDTA) tratado com 1 µL de RNAase por 30 minutos a 37°C. A RNAase foi removida duas vezes utilizando volume igual de cloroformio:álcool isoamílico (24:1). A qualidade e a quantidade de RNA foram asseguradas por gel de eletroforese e espectrofotometria, respectivamente. Os cDNAs foram obtidos a partir de 2µg de RNA, por meio da utilização de SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante.

Após isso, foi efetuada a reação de PCR utilizando *Primers* já utilizados por Han et al. (2012), conforme apresentado na tab.16, cuja sequências do gene da ALS de *R. raphanistrum* L. (AJ344986) encontram-se depositadas no Banco de Genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabela 16- Primers usados para sequenciamento do gene da ALS em biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio. FAEM/UFPel. Capão do Leão, RS, 2015.

Primer	Sequencia (5' - 3')
WR122F	TCTCCCGATACGCTCCCGACG
WR205R	GCAAGCTGCTGCTGAATATCC
WR376R	TTGCGAGTACTTTGATGGGG
WR574F	TTGTCATCATCAGGCCTTGGA
WR653R	TCAGTACTTAGTGCGACCATC

*primers obtidos de Han et al. (2012).

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume final de 100µL contendo 5µL de cDNA, 1 µM dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) (conforme apresentados na tab. 16), 50µL de GoTaq™ Green Master Mix, 2x

(Promega™) e água isenta de nuclease. Para a desnaturação foi do DNA foi utilizada temperatura de 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; para anelamento dos *primers* foi utilizada temperatura de 55°C por 30 segundos e; para extensão da sequência foi utilizada temperatura de 72°C durante 30 a 120 segundos (HAN et al., 2012).

Após obtidos os *amplicons*, a reação de PCR foi purificada usando a PCR Purification Combo Kit (Invitrogen™-USA) e as amostras submetidas para um serviço de sequenciamento comercial no Laboratório Ludwig Biotec, Alvorada - RS, utilizando um sequenciador ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Analisou-se as sequências do gene da enzima ALS obtidas de todos os biótipos para a presença de mutação responsável pela resistência ao herbicida onde foram comparadas entre si e alinhadas usando o programa Sequencer 5.1®. A confirmação das sequências obtidas foram previamente comparadas com sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

3.2.3 Metabolização

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel utilizando o delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. As plantas foram produzidas em bandejas sendo transplantadas para os vasos três dias após a emergência. Cada unidade experimental foi composta de uma planta que foram colocadas em vasos com capacidade volumétrica de 0,75L contendo solo + substrato, conforme descrito no capítulo I, onde a fertilidade foi previamente corrigida conforme análise de solo e a necessidade da cultura.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial, onde o fator A compreendeu os biótipos de nabo (B₁- suscetível e o B₄ e B₁₃ resistente ao herbicida iodosulfurom-metílico) e, o fator B avaliou os inibidores da citocromo P₄₅₀ monooxigenase (malathion e butóxido de piperolina). Os tratamentos foram malathion e butóxido de piperolina (PBO) aplicados isolados; malathion e butóxido de piperolina aplicados 30 minutos da aplicação do herbicida iodosulfurom-metílico; iodosulfurom-metílico isolado e; a testemunha sem aplicação, totalizando seis tratamentos.

As plantas foram submetidas à aplicação dos tratamentos quando estavam em estágio de três-quatro folhas. A aspersão dos herbicidas e do malathion foi realizada isoladamente, utilizando pulverizador costal pressurizado a CO_2 , com ponta de pulverização do tipo leque 110.02, espaçadas a 50 cm, a pressão constante de 1 bar ($1,0197 \text{ kgf cm}^{-2}$), regulado para um volume de calda equivalente a 120 L ha^{-1} . Trinta minutos antes da aplicação do herbicida iodosulfurom-metílico sódio, na dose de $3,5 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, aplicou-se os inibidores de metabolização malathion na dose de $500 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ e PBO, na dose de $525 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ (YU et al., 2009).

As avaliações visuais foram realizadas aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA), e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) foi avaliada aos 28 DAA. A avaliação de controle foi realizada utilizando-se escala percentual, onde zero (0%) representou ausência de injúrias e, cem (100%) a morte total das plantas (FRANS; CROWLEY, 1986). Para a determinação da MMSPA foi realizada a coleta do material que foi secado em estufa de circulação forçada de ar a 60°C até obter massa constante e, posteriormente foi pesado sendo o valor transformado para MMSPA planta⁻¹.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Observada significância estatística, realizou-se o teste de Duncan ($p \leq 0,05$) para os fatores biótipos e inibidores.

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados e discussão serão apresentados de acordo com a sequência de atividades apresentadas no material e métodos.

3.3.1 Atividade enzimática

A atividade da enzima ALS em biótipos de *R. sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) ao herbicida iodosulfurom-metílico foi obtido através da quantidade de acetoína produzida e em função do teor de proteína. Os valores para cada biótipo foram obtidos através das curvas padrão de acetoína e de proteína, conforme amostrado nas fig. 5 e 6.

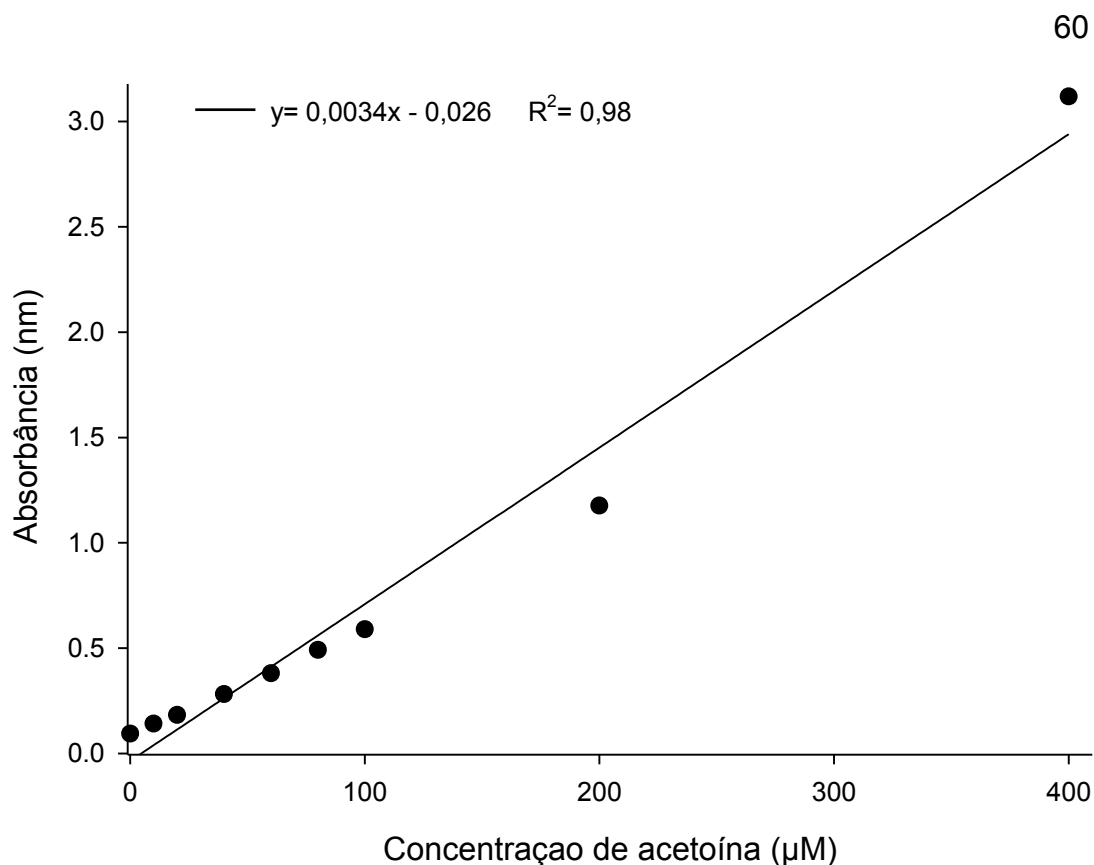


Figura 5- Curva padrão de acetoína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios de três repetições.

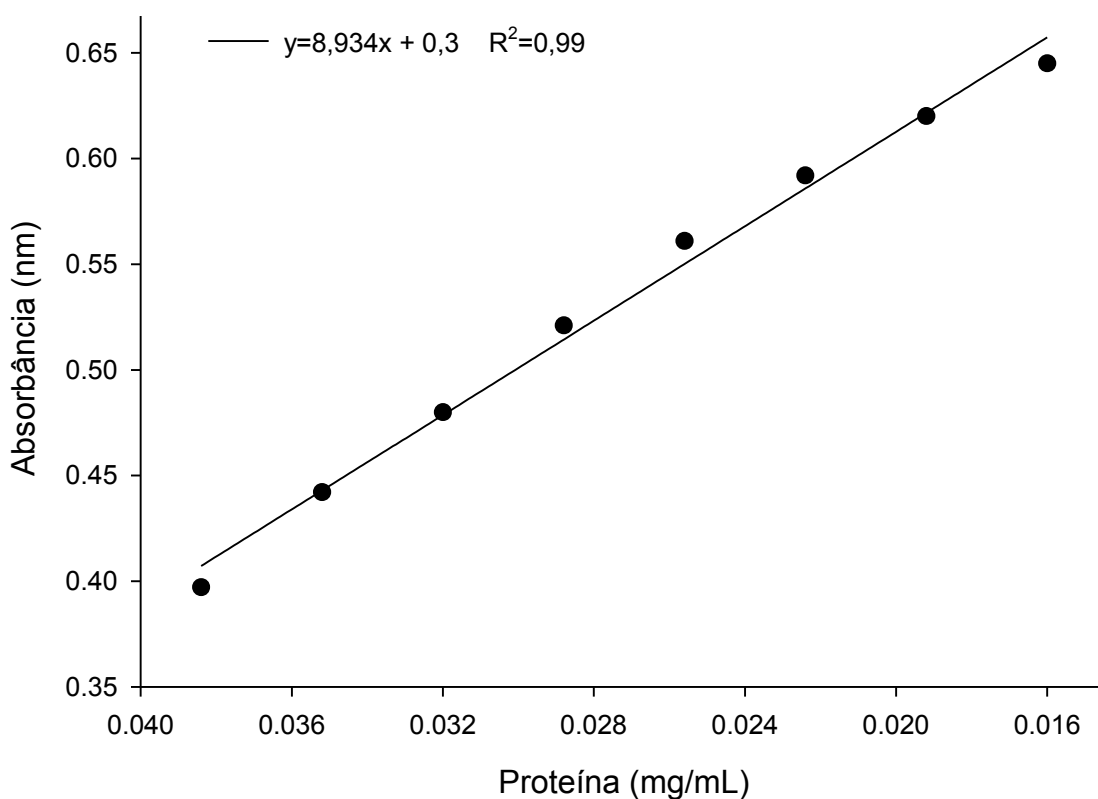


Figura 6- Curva padrão de proteína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios de três repetições.

3.3.1.1 K_m e $V_{m\acute{a}x}$

A atividade da enzima ALS em função da concentração de piruvato no meio apresentou variações entre os biótipos de *R. sativus* L. avaliados (Fig. 7). A atividade da enzima ALS do B₄, na concentração de 100 mM de piruvato, foi 35% superior ao B₁₃ e 428% superior ao biótipo suscetível (B₁) (Fig. 7). Já o B₁₃ apresentou atividade da enzima ALS superior a 316% quando comparado ao B₁ na concentração de 100mM de piruvato (Fig. 7).

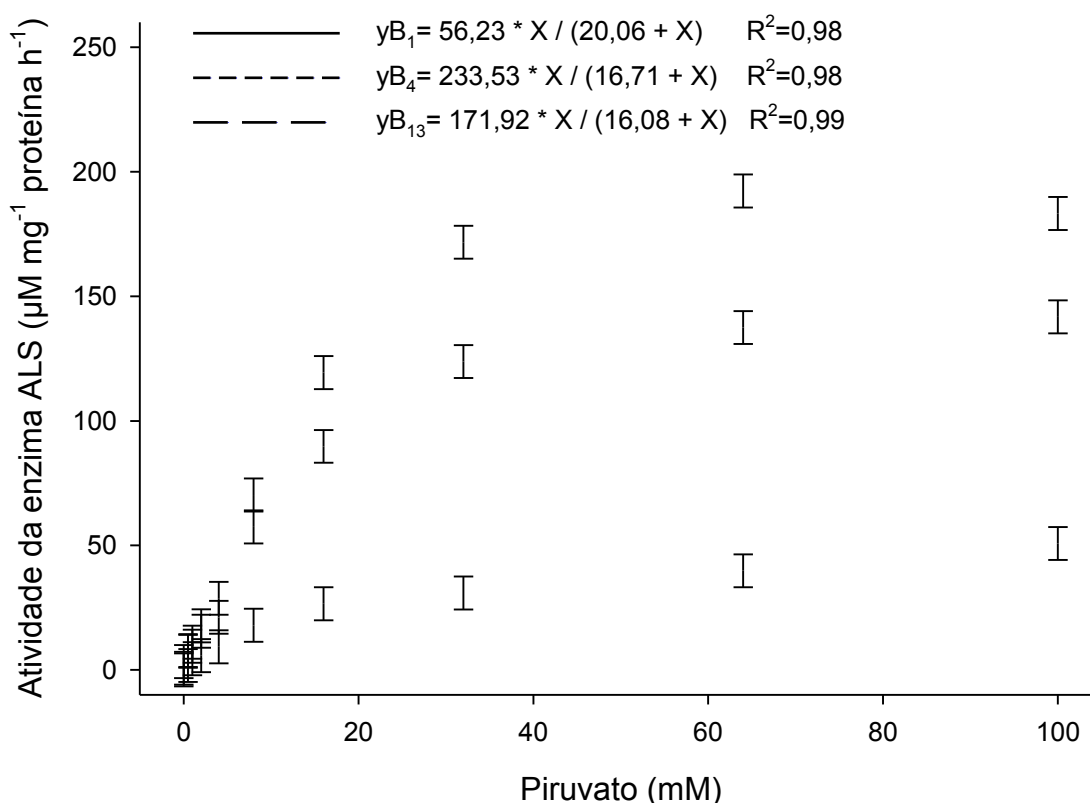


Figura 7- Atividade da enzima ALS ($\mu\text{M mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódico em função da concentração de piruvato (mM) para cálculo do K_m e $V_{m\acute{a}x}$. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e as barras representam a diferença mínima significativa ($p < 0,05$).

Alterações na sensibilidade da enzima são dependentes do tipo de mutação podendo estas ocasionar efeitos em certos aminoácidos que, quando alterados, podem afetar a ligação do substrato e, dessa forma, alterar a funcionalidade da enzima ALS (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Biótipos resistentes de *Lolium rigidum* (Gaudin) com mutação da Pro₁₉₇-Arg e da Trp₅₇₄-Leu apresentaram de 40 a 55%

maior atividade da enzima ALS, respectivamente, quando comparados ao biótipo suscetível. A mutação do aminoácido Trp₅₇₄-Leu ocasionou leve redução no aminoácido valina e não ocasionou alteração dos aminoácidos isoleucina e leucina (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

Os valores de K_m (piruvato) dos biótipos foram semelhantes, porém o $V_{m\acute{a}x}$ da ALS dos biótipos resistentes (B_4 e B_{13}) foi superior quando comparados ao suscetível (tab. 17). O $V_{m\acute{a}x}$ observado nos biótipos B_1 , B_4 e B_{13} foi de 56,23, 233,53 e 171,92 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , respectivamente. Os valores observados em B_4 e B_{13} são 415 e 305% superiores quando comparados ao B_1 (tab. 17). Resultados similares foram obtidos em biótipos de *Cyperus difformis* L. resistentes ao herbicida pirazosulfurom-etílico onde o K_m foi semelhante e o $V_{m\acute{a}x}$ foi 52% superior no biótipo resistente (DAL MAGRO et al., 2010).

Tabela 17- Valores de K_m (mM) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1}) de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) ao herbicida iodosulfurom-metílico. FAEM/UFPel. Capão do Leão, RS, 2015.

Biótipo	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1})
B_1 (suscetível)	20,06 ^{ns}	56,23 C
B_4 (Resistente)	16,71	233,53 A
B_{13} (Resistente)	16,08	171,92 B
C.V. (%)		6,44

*médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns}= não significativo ($p \leq 0,05$).

A maior afinidade com a enzima ALS observada em biótipos resistentes (K_m menor) pode estar relacionada com a alteração da conformação da enzima com possível alteração no local de ação (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a, XAVIER et al., 2013) que, dependendo do tipo de mutação podem alterar a funcionalidade da enzima ALS. Mutações do Trp₅₇₄-Leu na enzima ALS em biótipos resistentes de *L. rigidum* (Gaudin) acarretaram em K_m similar ao biótipo suscetível e $V_{m\acute{a}x}$ 287% superior ao suscetível (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Todavia, a eficiência na conversão de piruvato pode ser aumentada desde que o $V_{m\acute{a}x}$ seja superior, pois como se trata de ligação não competitiva com o substrato, o acoplamento pode ocorrer no mesmo local ou em diferentes locais da enzima (DEWAELE et al., 1997). Esta situação foi evidenciada por Xavier et al. (2013) em biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistente a herbicidas inibidores da ALS, onde biótipos resistentes apresentaram maior $V_{m\acute{a}x}$ quando comparados ao suscetível.

De maneira em geral, os herbicidas inibidores da ALS obstruem o canal que leva ao sítio ativo da enzima e, qualquer alteração nesse canal, impede a ligação dos herbicidas, mantendo a conformidade da enzima e sua funcionalidade (MCCOURT et al., 2006). Estudos evidenciam que plantas daninhas resistentes a herbicidas inibidores da ALS que possuem o local de ação alterado não apresentaram alterações nos seus parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) quando comparados a plantas suscetíveis (EBERLEIN et al., 1997; TANAKA, 2003; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; SANTOS et al., 2014) resultando em insensibilidade da enzima (DAL MAGRO et al., 2010; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; BOZIC et al., 2012; XAVIER et al., 2013). Entretanto, os resultados demonstraram que houve aumento do $V_{m\acute{a}x}$ nos biótipos de *R. sativus* L. resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico, indicando que pode haver superexpressão da enzima alvo (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Todavia, apesar da mutação ser prejudicial, a enzima pode compensar aumentando a velocidade de reação, pois ela é inversamente proporcional a energia livre de ativação que, devido à alta especificidade da enzima ALS, esta tende a optar por uma rota menos energética (TAIZ; ZEIGER, 2009). Diferenças entre a energia livre de ativação de herbicidas do grupo químico das sulfonilureias podem correlacionar com uma maior ou menor especificidade ao sítio ativo (CHEN et al. 2013) e, dessa forma, afetar a eficácia do herbicida.

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

A análise de variância indicou interação entre os fatores biótipos e doses do herbicida iodosulfurom-metílico sódio no ensaio *in vitro* da enzima ALS. Os dados de inibição da atividade da enzima ALS na presença do herbicida iodosulfurom-metílico sódio dos biótipos de nabo suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) ajustaram-se as curvas sigmóides, onde os valores do coeficiente de determinação (R^2) variaram de 0,95 a 0,99, demonstrando ajuste satisfatório dos dados ao modelo (Fig. 8).

Os resultados demonstraram que é necessário 0,043 μM do herbicida iodosulfurom-metílico para inibir 50% da atividade (I_{50}) da enzima ALS do biótipo suscetível de *R. sativus* L. enquanto que a I_{50} dos biótipos resistentes (B_4 e B_{13}) foi necessário 0,65 e 0,82 μM do herbicida, respectivamente (tab. 18). Alta inibição da enzima ALS foi verificado em biótipos de *L. rigidum* (Gaudin) onde, doses de 0,0075 μM para a enzima ALS do biótipo suscetível e, doses entre 0,71 e 1,81 μM para os

biótipos resistentes ao herbicida sulfometurom foram suficientes para reduzir 50% da atividade enzimática, dependendo da posição em que houve mutação (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos em biótipos de *R. raphanistrum* L. onde o I_{50} da enzima ALS do biótipo resistente e suscetível ao herbicida clorosulfurom foi de 1,55 e 0,009 μM , respectivamente, (YU et al., 2012).

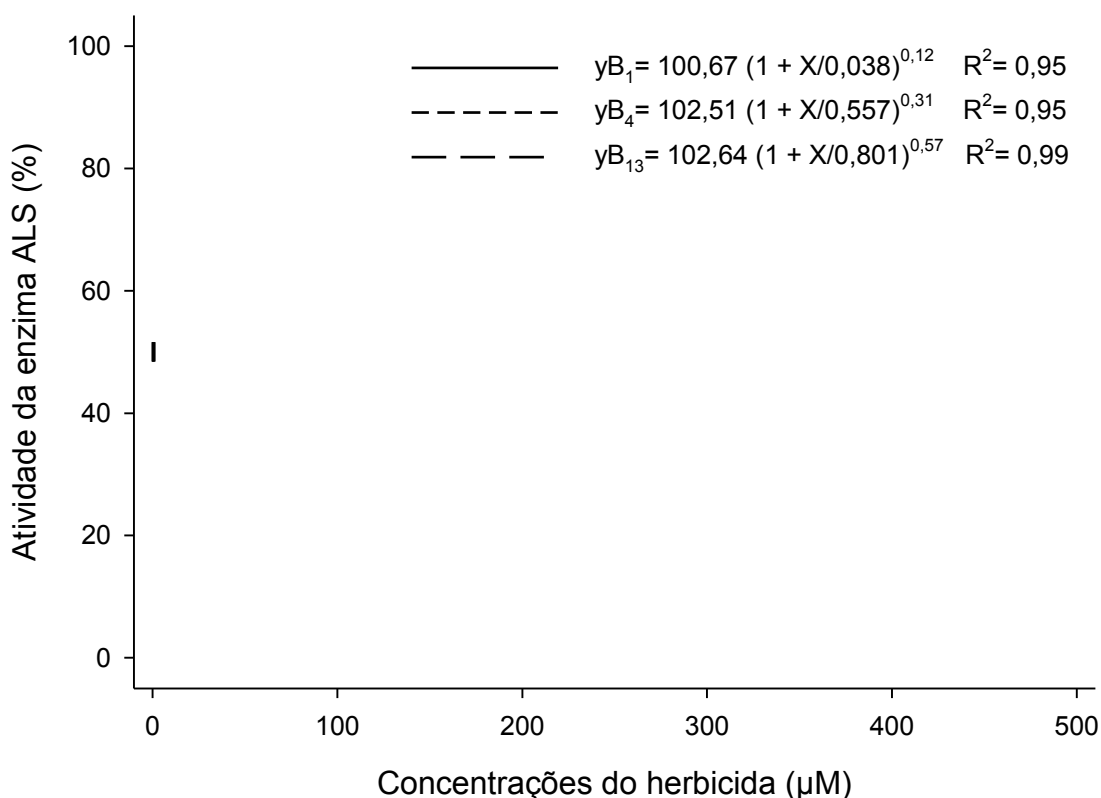


Figura 8- Inibição *in vitro* da atividade da enzima ALS (%) em biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) submetido a doses (μM) do herbicida iodosulfurom-metilico. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das três repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de inibição da atividade da enzima ALS na planta, com 95% de significância.

Tabela 18- Valores do I_{50} com intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metilico. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Biótipo	I_{50}^1		Fator de resistência ² (FR)
	μM	95 IC	
Suscetível (B_1)	0,043	0,09 - (-)0,004	-
Resistente (B_4)	0,65	1,05 – 0,25	15,00
Resistente (B_{13})	0,82	1,00 – 0,64	19,00

¹ I_{50} = dose necessária para obter uma inibição de 50% da atividade da enzima ALS.

²FR obtido pela divisão do I_{50} do biótipo resistente pelo I_{50} do biótipo suscetível

Com base na não sobreposição dos intervalos de confiança (IC) (tab. 14) entre o biótipo suscetível (B_1) e os resistentes (B_4 e B_{13}) foi possível estabelecer o fator de resistência (FR). O valor de FR constatado foi de 15 e 19 para o B_4 e B_{13} , respectivamente (tab. 18). Espécies resistentes a herbicidas inibidores da ALS com local de ação alterado podem apresentar maior FR (HAN et al., 2012). Estudos conduzidos por Yu et al. (2012) em biótipos de *R. raphanistrum* L. obtiveram FRs variando de 0,76 para o herbicida imazapir até 529 para o herbicida sulfometurom. Entretanto, é comum a utilização de doses elevadas de herbicidas inibidores da enzima ALS para controle de plantas resistentes, podendo inviabilizar a sua utilização (MONJARDINO; PANNELL; POWLES, 2003; LAMEGO et al., 2009; BECKIE et al., 2012).

Esses resultados confirmam que a sensibilidade da enzima ALS aos herbicidas avaliados em biótipos resistentes de *R. sativus* L. foi alterada, possivelmente devido a mutação no gene que codifica a enzima ALS e/ou devido a diferenças entre a energia livre de ativação para ocorrer a reação, resultando em maior $V_{\text{máx}}$ em biótipos resistentes.

3.3.2 Sequenciamento da enzima ALS

Um fragmento de 1758pb do gene ALS com as cinco regiões conservadas foi sequenciada a partir do cDNA de biótipos de *R. sativus* L. suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) ao herbicida iodosulfurom-metílico. Essa região sequenciada incluiu os domínios em que são conhecidos pontos de mutação em biótipos de *R. raphanistrum* L. resistentes a herbicidas da ALS, conforme descritos no *ALS Mutation Database* (TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2015). A sequência parcial da ALS nos biótipos de nabo suscetível e resistentes analisada evidenciou que houve mutação na posição 574 com substituição do aminoácido Triptofano por uma Leucina (Trp₅₇₄-Leu) estando associado com a resistência ao herbicida iodosulfurom-metílico (tab. 19).

Esta mutação já foi identificada em diversas espécies de plantas daninhas resistentes a ALS, incluindo biótipos de *R. raphanistrum* L. sendo considerada uma das mais problemáticas por conferir resistência aos cinco grupos químicos de herbicidas inibidores da enzima ALS (TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2015; TAN; MEDD, 2002). Entretanto, não há relatos dessa mutação em biótipos de *R. sativus* L. resistentes a

herbicidas da ALS, sendo considerado o primeiro caso identificado. Essa mutação pode ser considerada a causa principal da resistência cruzada diagnosticada para todos os grupos químicos da ALS, conforme descrito no capítulo I deste trabalho.

Tabela 19- Comparação das sequências parciais do gene da enzima Acetolactato sintase (ALS) dos biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃) ao herbicida iodosulfurom-metílico e sua correspondente sequência de aminoácidos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Posição do Aminoácido:	122 ¹	197	574
Aminoácido:	Ala	Pro	Trp
Sequência nucleotídica ² :	GCC	CCT	TGG
B ₁ (Susc.)	GCC	CCT	TGG
B ₁ (Susc.)	GCT ³	CCT	TGG
B ₁ (Susc.)	GCT	CCT	TGG
B ₄ (Resist.)	GCT	CCT	TTG – Leu ⁴
B ₄ (Resist.)	GCT	CCT	TTG - Leu
B ₄ (Resist.)	GCT	CCT	TTG - Leu
B ₁₃ (Resist.)	GCT	CCT	TTG - Leu
B ₁₃ (Resist.)	GCT	CCT	TTG - Leu
B ₁₃ (Resist.)	GCT	CCT	TTG - Leu

¹Os aminoácidos foram numerados com base na sequência do gene da enzima ALS de *Raphanus raphanistrum* (AJ344986.1) do NCBI (2014).²Sequência parcial do gene da enzima ALS em *Raphanus raphanistrum* suscetível aos herbicidas clorosulfurom, metosulam e imazamox (HAN et al., 2012).³Mutação silenciosa.⁴Mutação diagnosticada; Ala= Alanina; Pro= Prolina; Trp= Triptofano e Leu= Leucina.

Em biótipos de *R. raphanistrum* L. outros pontos de mutação foram diagnosticados (TRANIEL; WRIGHT; HEAP, 2015). As mutações mais frequentes envolvem a Pro₁₉₇, com quatro casos, sendo esta substituída por uma Alanina, por uma Treonina, por uma Histidina ou por uma Serina (TAN; MEDD, 2002, YU et al., 2003) conferindo resistência ao grupo químico das sulfonilureias e das triazolopirimidinas. Em outro caso relatado houve a substituição do Asp₃₇₆ por Ácido Glutâmico (YU et al., 2012) conferindo elevado grau de resistência ao grupo das sulfonilureias e das triazolopirimidinas e, resistência intermediária ao grupo das imidazolinonas. Já a mutação envolvendo a Ala₁₂₂ por uma Tirosina (HAN et al., 2012) confere elevado nível de resistência aos três grupos químicos.

Para a posição Ala₁₂₂, mutações silenciosas foram detectadas nos biótipos testados onde o códon GCC foi substituído para GCT, exceto em uma das repetições do biótipo suscetível (tab.19), porém, nenhuma delas resultou em alteração do aminoácido Alanina. Esta mutação é menos comum, pois necessita de

duas alterações nucleotídica para que ocorra mudança do aminoácido enquanto as demais exigem apenas uma alteração do nucleotídeo (YU et al., 2003; 2012).

Para Han et al. (2012) altos níveis de resistência podem ocorrer dependendo da posição do aminoácido alterada. A mutação diagnosticada nesse estudo (Trp₅₇₄-Leu) pode ser considerada uma das mais preocupantes, pois confere resistência a todos os grupos químicos de herbicidas inibidores da enzima ALS (TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2015), reduzindo as opções de controle para biótipos resistentes.

3.3.1 Metabolização

O teste de Shapiro-Wilk demonstrou não ser necessária a transformação dos dados. Observou-se interação entre os fatores para todas as épocas avaliadas e para a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (tab. 20).

O herbicida iodosulfurom-metílico aplicado associado com os inibidores (malathion ou PBO) não proporcionou controle satisfatório dos biótipos resistentes (B₄ e B₁₃) (tab. 20). Entretanto, é observado para o biótipo B₁₃ que, o tratamento iodosulfurom-metílico+malathion proporcionou 31% de controle aos 14 DAA. Este resultado evidencia a inibição da P₄₅₀ monooxygenase pelo inseticida malathion pode, embora pequeno, indicar o envolvimento da P₄₅₀ na resistência no biótipo B₁₃, pois a mesma associação não causou efeitos para o biótipo resistente (B₄) (ta. 20). Em trabalho conduzido em biótipos de *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., a utilização dos inibidores de metabolização PBO e malathion, aplicados previamente ao imazetapir, reduziu o fator de resistência (MATZENBACHER, 2012).

Aos 28 DAA, a aplicação do herbicida isolado, iodosulfurom-metílico+malathion e iodosulfurom-metílico+PBO não acarretaram em diferenças de controle para os biótipos B₁ (suscetível) e B₄ (resistente) (tab.20). Para o biótipo B₁₃, a aplicação do iodosulfurom-metílico+ malathion proporcionou 21% de controle, diferindo dos demais tratamentos (tab. 20). Em biótipos de *Lolium rigidum* Gaudin, a aplicação prévia de malathion seguida de clorosulfurom apresentou efeito sinérgico quando comparado com a aplicação isolada, melhorando o controle do biótipo resistente (YU; POWLES, 2014a)

Este maior nível de controle observado em B₁₃ resultou em menor acúmulo de MMSPA quando comparado a aplicação isolada do herbicida (tab. 20). Em biótipos de *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) tratados com malathion previamente à aplicação do herbicida penoxsulam houve aumento do controle e menor massa da

matéria fresca em relação a plantas tratadas apenas com penoxsulam, sugerindo o envolvimento da citocromo P₄₅₀ no metabolismo do herbicida (YASUOR et al., 2009). Para Yu et al. (2009) o inseticida malathion por inibir a enzima pode reverter a resistência de biótipos resistentes a herbicidas. Todavia, a expressão da citocromo P₄₅₀ monooxigenase que confere resistência por metabolização pode ser influenciada por fatores ambientais (MILDER; READE; COBB, 2007)

Tabela 20- Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) em gramas planta⁻¹ de biótipos de *Raphanus sativus* L. suscetível (B₁) e resistentes (B₄ e B₁₃), submetidos à aplicação de herbicida iodosulfurom-metílico, isolado ou antecedido em trinta minutos da aplicação dos inibidores do citocromo P₄₅₀ monooxigenase (malathion e PBO) e testemunha sem aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Tratamento	14 DAA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Iodosulfurom-metílico	82,0	aB	2,0	bA	0,0	bC
Malathion	0,0	^{ns} D	1,0	A	0,0	C
PBO	3,0	^{ns} D	1,0	A	2,0	C
Iodosulfurom-metílico+Malathion	67,0	aC	2,0	cA	31,0	bA
Iodosulfurom-metílico+PBO	88,0	aA	3,0	cA	15,0	bB
Testemunha	0,0	^{ns} D	0,0	A	0,0	C
C.V. (%)	19,77					
Tratamento	28 DAA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Iodosulfurom-metílico	99,0	aA	5,0	bA	0,0	bB
Malathion	3,0	^{ns} BC	1,0	A	0,0	B
PBO	5,0	^{ns} B	2,0	A	1,0	B
Iodosulfurom-metílico+Malathion	100,0	aA	4,0	cA	21,0	bA
Iodosulfurom-metílico+PBO	99,0	aA	2,0	bA	4,0	bB
Testemunha	0,0	^{ns} C	0,0	A	0,0	B
C.V. (%)	18,00					
Tratamento	MMSPA					
	B ₁		B ₄		B ₁₃	
Iodosulfurom-metílico	0,43	bC	1,74	aAB	1,84	aA
Malathion	1,43	bB	2,11	aA	1,46	bAB
PBO	1,26	bB	1,88	aAB	1,86	aA
Iodosulfurom-metílico+Malathion	0,33	bC	1,58	aAB	1,11	aB
Iodosulfurom-metílico+PBO	0,25	bC	1,45	aB	1,24	aB
Testemunha	1,88	^{ns} A	2,01	AB	1,87	A
C.V. (%)	20,18					

*médias seguida de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{ns}= não significativo (p≤0,05).

Os níveis de controle observados nesse estudo não apontam possível envolvimento deste complexo enzimático na resistência de *R. sativus* L. ao herbicida iodosulfurom-metílico, comprovando a hipótese que o mecanismo envolvido na resistência dos biótipos deve-se a alteração do local de ação da enzima alvo devido a mutação diagnosticada na Trp₅₇₄-Leu.

3.4 Conclusões

O K_m da enzima ALS dos biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes B₄ e B₁₃ ao herbicida iodosulfurom-metílico são semelhantes ao do biótipo suscetível B₁ e, o $V_{máx}$ da enzima ALS dos biótipos B₄ e B₁₃ foram superiores daqueles observados para o biótipo B₁;

A resistência dos biótipos B₄ e B₁₃ são decorrentes da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida iodosulfurom-metílico devido à mutação identificada na posição 574 do gene resultando na substituição do aminoácido Triptofano por Leucina (Trp₅₇₄-Leu);

Os biótipos de nabo resistentes B₄ e B₁₃ não apresentam metabolização diferencial do herbicida iodosulfurom-metílico através do complexo enzimático da P₄₅₀ monooxigenase, porém a utilização do iodosulfurom-metílico+malathion possibilitou melhor controle no B₁₃ com redução da MMSPA.

4. CAPÍTULO III – Valor adaptativo de biótipos de *Raphanus sativus* L. resistente e suscetível a herbicidas inibidores da ALS

4.1 Introdução

O *Raphanus sativus* L. (nabo) é uma espécie daninha dicotiledônea, pertencente à família Brassicaceae, possui fecundação cruzada e se desenvolve em ambientes temperados e subtropicais (KISSMANN, 2007). É uma espécie que apresenta resistência cruzada a herbicidas inibidores da ALS na Argentina, no Chile e no Brasil (HEAP, 2015) e, está presente em cultivos de inverno onde tem causado sérios prejuízos na produção final (BOZ, 2005; ESLAMI et al., 2006; RIGOLI et al., 2008).

O uso intenso de herbicidas inibidores da ALS favoreceu o surgimento de biótipos resistentes (THEISEN, 2008, YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; PANDOLFO et al., 2013). A resistência consiste na habilidade herdada de uma planta em sobreviver a um herbicida que, em condições normais, controlam os demais indivíduos da população (VARGAS et al., 2009). Para Délye (2013b), as práticas de manejo, que visam eliminar as plantas daninhas, aumentam a pressão de seleção e influenciam na evolução de características adaptativas de uma população direcionando para a resistência.

O problema da resistência é agravado quando as plantas daninhas são consideradas uma das principais causas bióticas responsável por perdas de produtividade, visto que biótipos resistentes possuem vantagens em sobreviver aos herbicidas quando comparados as plantas suscetíveis (DÉYLE, 2013b). Em geral, as plantas utilizam seus recursos para reprodução, crescimento e funções de defesa (VILA-AIUB et al., 2005), no entanto, biótipos resistentes adquirem mecanismo de resistência e podem acarretar em efeitos pleiotrópicos positivos ou negativos,

geralmente dependentes do ambiente e do alelo relacionado (BERGELSON, PURRINGTON, 1996; MENCHARI et al., 2008; VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a; LI et al., 2013; DÉYLE, 2013b).

Os estudos de adaptabilidade ou valor adaptativo (*"fitness"*) de uma espécie constituem-se em importante ferramenta para entender o comportamento sobre os componentes de crescimento, sobrevivência e produção de sementes viáveis das espécies, em função do aproveitamento dos recursos de crescimento em determinado nicho ecológico (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007), além de ser indicativo da capacidade de infestação de um biótipo numa área.

As principais alterações que os biótipos podem expressar em relação ao valor adaptativo são a redução dos parâmetros de crescimento, atividade fotossintética diferenciada, redução na capacidade de competir por recursos e em produzir sementes (AHRI, 2013). Modificações nas características fisiológicas e na taxa de crescimento da planta podem alterar a competitividade do biótipo e, portanto, sua dinâmica dentro da população, afetando diretamente as estratégias de manejo e prevenção da evolução da resistência (CHRISTOFFOLETI, 2001; VARGAS et al., 2009).

Para estudos de adaptabilidade, preconiza-se que os biótipos devem ser provenientes de mesma região, devendo-se avaliar o maior número possível de variáveis, é desejável ainda, que os biótipos sejam puros (homozigotos) e que sejam submetidos à competição com uma cultura (YU; POWLES, 2014b). Alguns estudos sobre o comportamento ecofisiológico de biótipos resistentes comparado a suscetíveis mostraram-se similares, mesmo que haja alteração genética e enzimática (RIZZARDI et al., 2002; SIBONY; RUBIN, 2003; YU; HAN, VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013), o que mostra a elevada capacidade de adaptação dos biótipos a mudanças ambientais através da alocação de recursos (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009B). Entretanto, custos de adaptabilidade podem ocorrer dependendo do ponto que ocorreu a mutação e da espécie envolvida (ELLSTRAND, 1999; TARDIF; RAJCAN; COSTEA, 2006; YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

Quando a resistência envolve metabolização pela citocromo P₄₅₀ a alocação de recursos em biótipos resistentes pode variar, onde estes tendem a ser menos competitivos que biótipos suscetíveis, por apresentarem menor crescimento vegetativo e menor alocação de recursos na fase reprodutiva (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a). Todavia, é evidente que biótipos resistentes possuem vantagens

em sobreviver quando comparados a biótipos suscetíveis na presença do herbicida (DÉLYE, 2013b).

O conhecimento das características ecológicas, bem como do comportamento bioecológico da espécie, torna-se necessário para estabelecer estratégias de manejo visando à prevenção da resistência.

Diante do exposto, este estudo teve como hipótese que biótipos resistentes de *Raphanus sativus* L. a herbicidas inibidores da ALS apresentam custos de adaptabilidade quando comparados ao suscetível.

O objetivo do estudo foi identificar e comparar o valor adaptativo dos biótipos de nabo resistente e suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico.

4.2 Material e Métodos

O experimento de valor adaptativo foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel no período de maio a outubro de 2014, em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 9, onde o fator A compreendeu os biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico provenientes da mesma região – vide tab.1 do capítulo I) e, o fator B foi composto das épocas de coleta do material vegetal (14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112 e 126 DAE).

As unidades experimentais foram compostas de uma planta de nabo, estabelecida em vaso, com capacidade volumétrica de 8L, contendo solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo e substrato GerminaPlant[®] na proporção 2:1. As correções da fertilidade do solo seguiram as recomendações para a cultura do nabo forrageiro conforme demonstradas no capítulo I.

As variáveis avaliadas, em cada época, foram: estatura, área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa seca de raiz (MSR). A estatura foi determinada com o auxílio de régua milimetrada tomando-se o comprimento da planta desde o nível do solo até o ápice com o limbo foliar estendido. A AF foi determinada com o auxílio do medidor de área foliar (modelo LI 3100C) utilizando-se apenas as folhas com pecíolo. A MMSPA (folhas e caule) e a MSR foram obtidas após secagem do material em estufa com circulação de ar e à temperatura de 60°C, até atingir massa constante, quando foram pesadas.

Aos 126 dias após a emergência foram determinados o número de flores remanescentes (flores planta⁻¹), o número de siliquas (siliquas planta⁻¹) e o número de sementes (sementes planta⁻¹) obtidas através de contagem individual por planta.

A matéria seca total (MST) foi obtida através do somatório da MMSPA e da MSR em cada época de amostragem (MAGALHÃES, 1979).

$$MST = MMSPA_1 + MSR_1$$

Os resultados de AF e MMSPA foram utilizados para determinar a taxa de crescimento (TC), a taxa de crescimento relativo (TCR) e a razão de área foliar (RAF). A TC, expressa em g planta⁻¹dia⁻¹, demonstra a velocidade média de crescimento das plantas ao longo do período observado (REIS; MULLER, 1978) obtida pela fórmula:

$$TC_{n-1} = (W_2 - W_1) / (t_2 - t_1) + TC_1,$$

onde: W_2 e W_1 são as MMSPA de duas amostragens sucessivas, t_2 e t_1 são os dias transcorridos entre as duas observações e TC_1 é a taxa de crescimento observada na amostra anterior.

A variável TCR, expressa em mg dia⁻¹, refere-se ao aumento na MMSPA por unidade de tempo em relação à massa da matéria seca inicial (RADFORD, 1967) sendo calculada pela equação:

$$TCR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

onde: $\ln W_2$ e $\ln W_1$ são o logaritmo neperiano da MMSPA de duas amostragens sucessivas e, t_2 e t_1 são os dias transcorridos entre as duas observações

A RAF, em cm² g⁻¹, expressa a área útil disponível para a fotossíntese (WEST; BRIGGS; KIDD, 1920) sendo calculada pela fórmula:

$$RAF = AF / MMSPA$$

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Caso constatada significância estatística, realizou-se análise de regressão para o fator épocas de avaliação utilizando o SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012) e, para o fator

biótipo, foi procedida a comparação entre médias utilizando o teste F ($p \leq 0,05$) para as variáveis flores planta⁻¹, síliquas planta⁻¹ e sementes planta⁻¹.

Para todas as variáveis mensuradas, exceto para a área foliar, os dados ajustaram-se a equação de regressão sigmoidal com três parâmetros conforme segue:

$$y = a / (1 + e^{-(x - x_0)/b})$$

onde: y = variável resposta de interesse; e = função exponencial; x = dias após a emergência e; os valores de a , b e x_0 são os parâmetros da regressão não linear do modelo com a = diferença entre a assíntota máxima e mínima; b = declive da curva, x_0 = dias após o transplante correspondente a 50% do rendimento da variável dependente para o valor da assíntota máxima (a).

Para a variável área foliar, os dados não se ajustaram a equação de regressão sigmoidal com três parâmetros e, dessa forma, não foram apresentados.

4.3 Resultados e Discussão

O teste de Shapiro Wilk indicou não ser necessária a transformação dos dados para o experimento de valor adaptativo com ajuste à equação sigmoidal para todas as variáveis ecofisiológicas, exceto para área foliar onde não foi constatada diferenças significativas. Para as demais variáveis verificou-se interação entre os fatores biótipos e época de avaliação (Fig. 9, 10, 12, 13, 14 e 15). Para a variável MSR, o efeito principal deu-se para o fator épocas de avaliação (Fig. 11) indicando acúmulo de matéria seca da raiz igual entre os biótipos testados.

A partir da análise de disposição das curvas, observou-se que o incremento de estatura dos biótipos ao longo do período ocorreu de forma sigmoidal (Fig. 9). Resultados semelhantes foram obtidos em biótipos de *Kochia scoparia* (L.) Roth resistente a herbicidas inibidores da ALS com crescimento sigmoidal entre os biótipos (LÈGERE et al., 2013). Através da diferença mínima significativa constatou-se que o comportamento dos biótipos de nabo foi similar até 112 DAE, sendo que na última época avaliada, o biótipo resistente (B_4) apresentou maior estatura comparado ao biótipo suscetível (B_1) (Fig. 9). Plantas com maior estatura tornam-se mais competitivas, especialmente na busca por radiação solar (FLECK et al., 2007; RIGOLI et al., 2009) e, dessa forma, tendem a apresentar poucas perdas em

produção (DUARTE; SILVA; SOUZA, 2002). Entretanto, em estudos com *Brassica rapa* L. resistente ao herbicida atrazina verificou-se que biótipos resistentes apresentaram menor estatura comparado ao suscetível sem que houvesse redução do potencial produtivo (NEWELL, 2006).

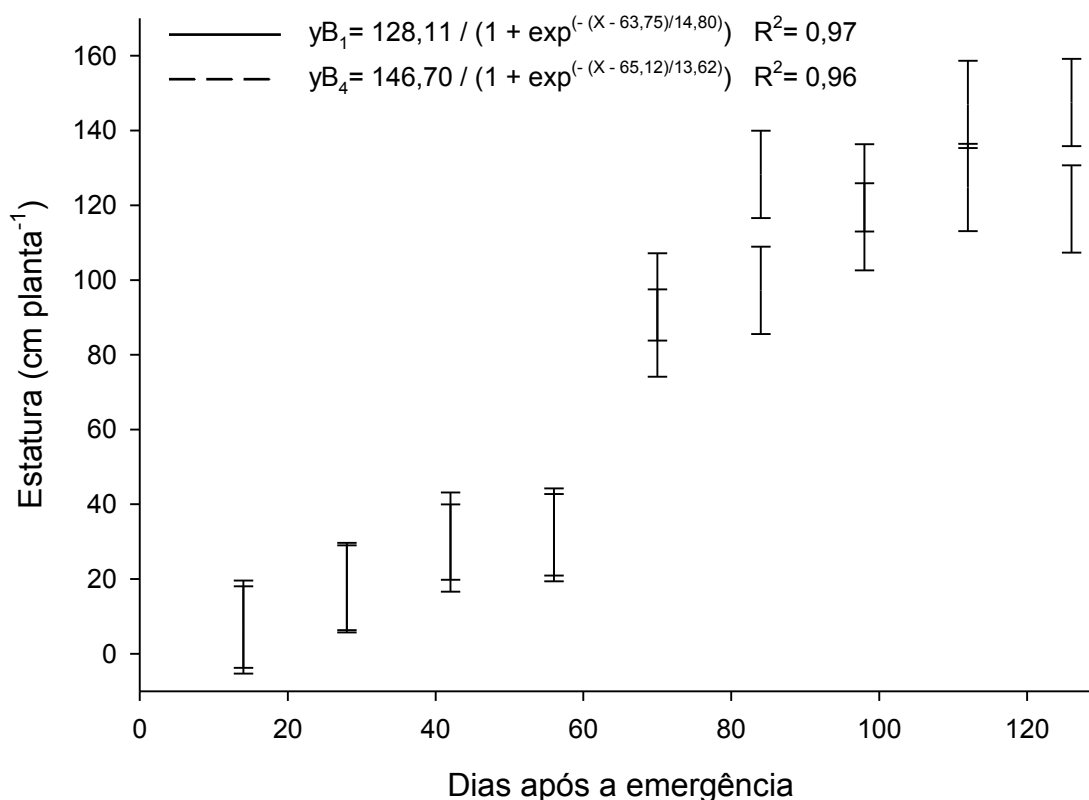


Figura 9- Estatura (cm planta⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metilico, avaliada dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPEI, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa (p<0,05).

Em relação aos resultados de AF, os dados não se ajustaram ao modelo de regressão sigmoide e, optou-se por não apresentar. Entretanto, verificou-se que os biótipos não apresentaram diferenças estatísticas significativas para a variável AF, onde foi evidenciado que a máxima área foliar ocorreu aos 70 DAE em ambos os biótipos (B₁ e B₄).

Para a variável MMSPA, os resultados demonstraram que os biótipos apresentam comportamento similar, com acúmulo crescente e máximo até 112 DAE, mantendo-se constante na época posterior (Fig. 10). Esses resultados corroboram com os obtidos em biótipos de *R. raphanistrum* L. resistentes a herbicidas inibidores da ALS, onde não houve alterações significativas no acúmulo de biomassa (LI et al.,

2013). Entretanto, Tardif, Rajca e Costea (2006) estudaram os custos de adaptabilidade de biótipos de *Amaranthus powelli* S. Wats resistentes a herbicidas da ALS, concluindo que há menor produção de biomassa em biótipos resistentes. Resultados similares foram encontrados por Alcocer-Ruthling, Thill e Shafii (1990) em biótipos de *Lactuca serriola* L. resistentes a sulfonilureias onde plantas resistentes acumularam menor MMSPA.

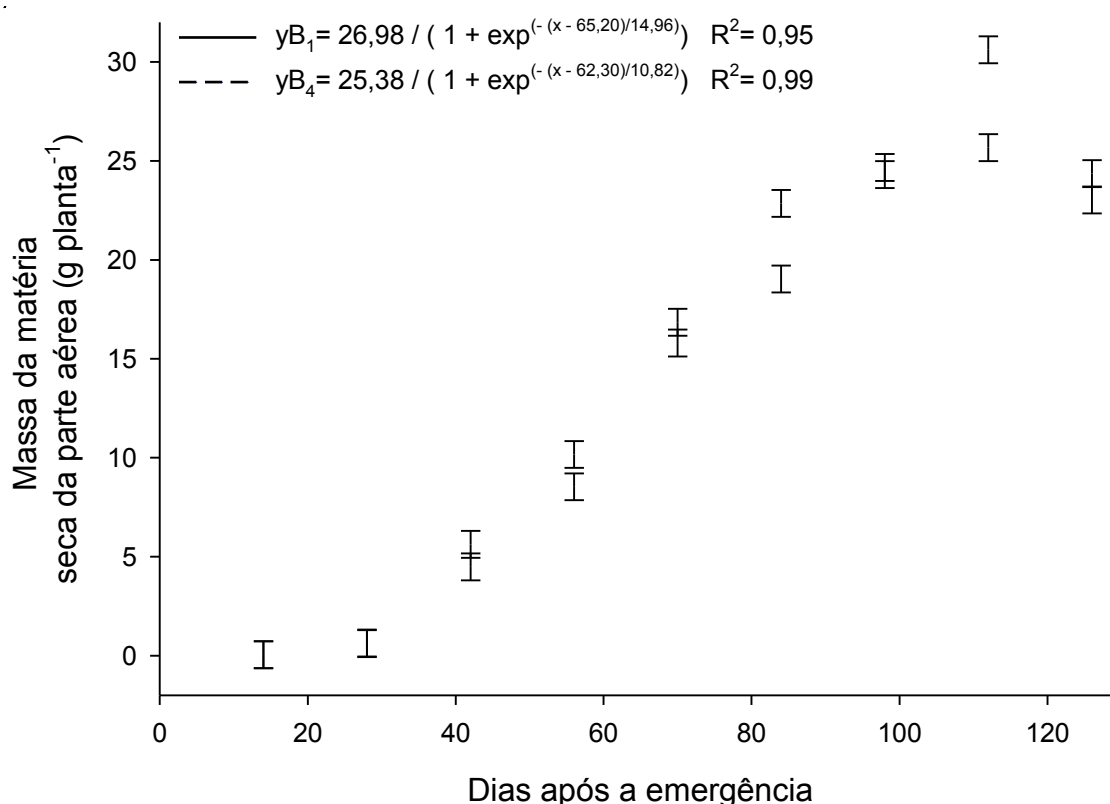


Figura 10- Massa da matéria seca da parte aérea (g planta⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa (p<0,05).

Para Benincasa (2003) o acúmulo de MMSPA é dependente do desempenho do sistema assimilatório proveniente da atividade fotossintética. Plantas que produzem maiores quantidades de matéria seca num curto espaço de tempo são mais competitivas, pois podem suprimir o crescimento de plantas vizinhas devido a redução dos recursos do meio que geralmente são limitados (FLECK et al., 2006; RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007).

Os resultados de acúmulo de MSR demonstraram que os biótipos não diferiram estatisticamente ao longo do período avaliado, onde o máximo acúmulo de MSR ocorreu aos 84 DAE com 4,7 g planta⁻¹ (Fig. 11). Resultados semelhantes foram obtidos por Brighenti et al. (2001) ao avaliar a MSR em biótipos de *E. heterophylla* L. resistentes a herbicidas da ALS onde não houve diferenças entre os biótipos. Vale ressaltar, que plantas com sistema radicular mais desenvolvido tendem a ser mais eficientes na captura dos recursos do solo e, dessa forma, serem mais competitivas. Todavia, não há evidências de custos de adaptabilidade relacionados para esta variável quando se trabalha com biótipos resistentes a ALS quando comparados a plantas suscetíveis (LI et al., 2013; DARMENCY et al., 2013).

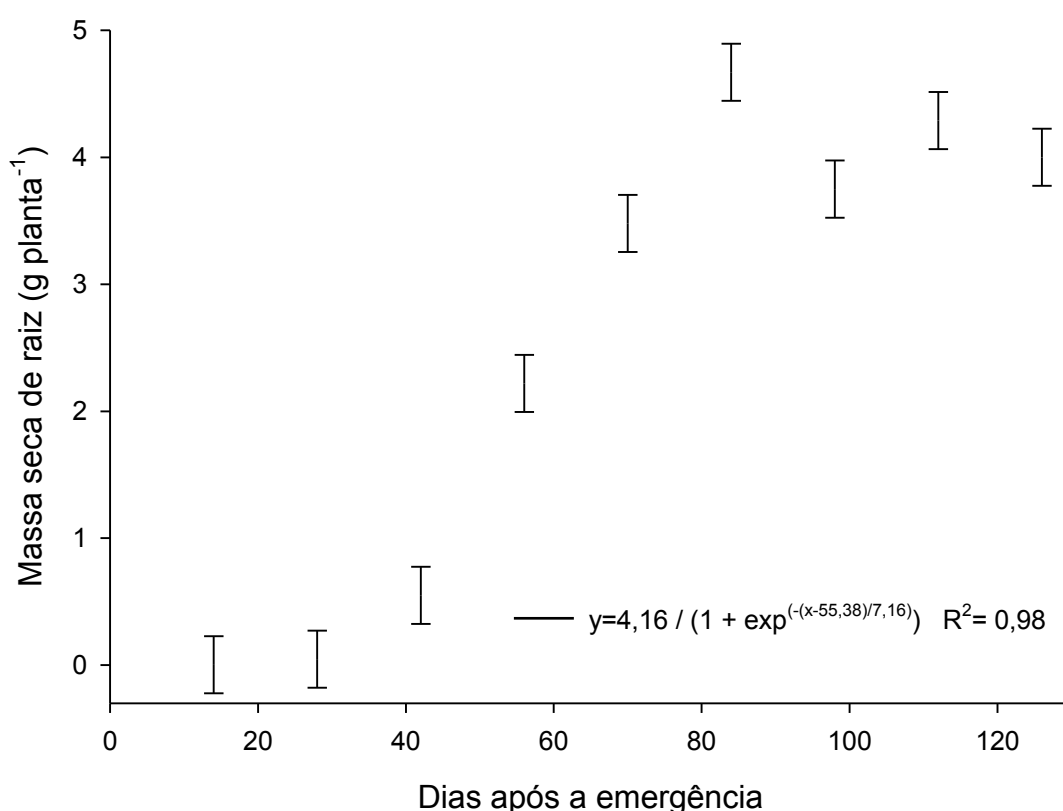


Figura 11- Massa seca de raiz média (g planta⁻¹) dos biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa ($p < 0,05$).

Para a variável MST, observou-se comportamento similar entre os biótipos ao longo das épocas avaliadas (Fig. 12). Os resultados encontrados são semelhantes aos obtidos por Costa (2013) em biótipos de *R. raphanistrum* L. onde não

houve diferenças no acúmulo de MST entre plantas suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da ALS. Todavia, biótipos de *Lolium multiflorum* resistentes ao herbicida glifosato tiveram menor acúmulo de MST quando comparado a biótipos suscetíveis (VARGAS et al., 2005), diferindo daqueles encontrados por Mariani (2014) em biótipos de *L. multiflorum* Lam. resistentes ao herbicida iodosulfurometílico sódio onde houve comportamento similar entre biótipos.

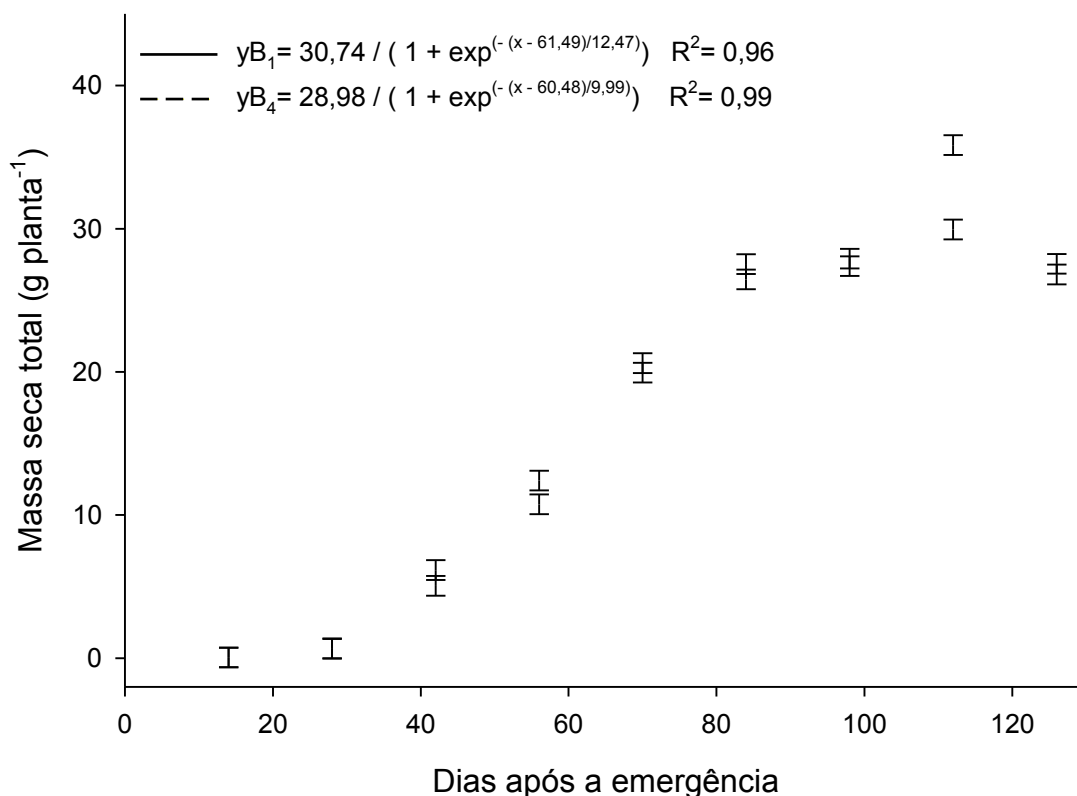


Figura 12- Massa seca total (g planta⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa (p<0,05)

O incremento de MST ocorreu de forma sigmoidal sendo que o maior acúmulo ocorreu aos 112 DAE para ambos os biótipos, onde a MST para B₁ foi de 35,8 g e B₄ foi de 29,9 g (Fig. 12). Sibony e Rubin (2003) em estudos com biótipos de *Amaranthus retroflexus* L. resistentes a herbicidas inibidores da ALS não encontraram diferenças de MST quando comparado com o biótipo suscetível. Entretanto, plantas que possuem capacidade de acumular maior quantidade de matéria seca tendem a ser mais competitivas (VARGAS et al., 2005).

Os resultados obtidos para a variável razão de área foliar (RAF) demonstraram que os biótipos B₁ e B₄ são similares (Fig. 13) corroborando com os resultados encontrados por Mariani (2014) em biótipos de *L. multiflorum* Lam. resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico.

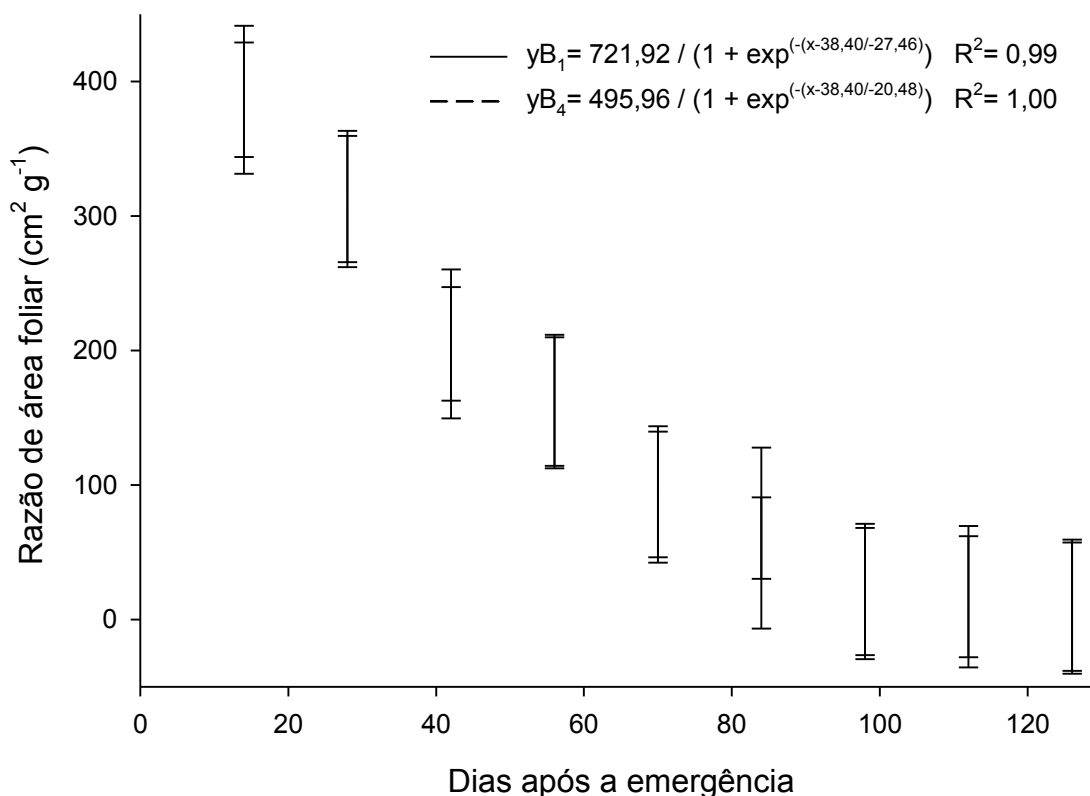


Figure 13- Razão de área foliar (cm² g⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa (p<0,05)

A RAF evidencia a translocação e partição de assimilados para as folhas em relação ao total de matéria seca produzida pela planta (SCOTT; BATCHELOR, 1979). O decréscimo observado ao longo do ciclo da planta pode ser decorrente da interferência exercida pelas folhas superiores sobre as inferiores (BRIGHENTI et al., 1993), além da formação de estruturas vegetativas ou reprodutivas, que constituem-se em drenos competitivos, como flores, frutos e sementes (BENINCASA, 2003), que reduzem a partição de fotoassimilados para as folhas, em relação à matéria seca total. O maior potencial competitivo está relacionado com a capacidade de uma planta interceptar energia luminosa e sombrear as demais sendo diretamente proporcional a RAF (FERREIRA et al., 2008). Entretanto, os resultados obtidos para

esta variável em biótipos de nabo demonstraram que houve comportamento semelhante, ou seja, que o potencial competitivo pode ser similar quando submetidos às mesmas condições.

Ao analisar a TC dos biótipos de nabo ao longo do período constatou-se que o comportamento foi similar (Fig. 14). Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Dal Magro et al. (2011) em biótipos de *C. difformis* L. resistente e suscetível ao herbicida pirazosulfurom e, com os de Mariani (2014) em biótipos de *L. multiflorum* Lam. resistentes ao herbicida iodosulfurom-metílico onde a TC de biótipos resistente e suscetível foram similares.

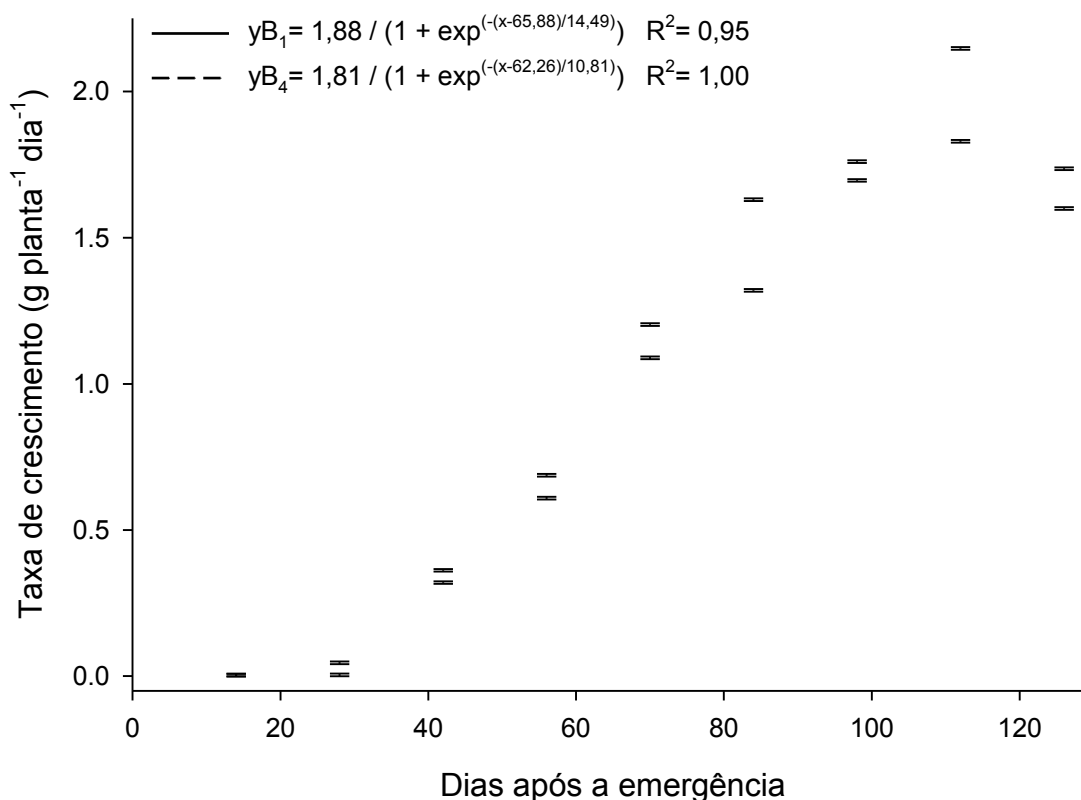


Figura 14- Taxa de crescimento (g planta⁻¹ dia⁻¹) de biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPeL, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa (p<0,05).

Os maiores incrementos de TC ocorreram entre 28 e 98 DAE com 0,34 g planta⁻¹ dia⁻¹ para ambos os biótipos, evidenciando que houve relação com o acúmulo de MMSPA e com outras variáveis como área foliar. Estes resultados corroboram com os de Brighenti et al. (2001) ao avaliar a TC em biótipos de *E. heterophylla* L. resistentes a herbicidas da ALS com incremento de 0,40 g planta⁻¹ dia⁻¹

em biótipos resistentes e suscetível. Schaedler et al. (2013) ao avaliarem a TC de biótipos de *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl resistentes e suscetível a herbicidas inibidores da ALS constataram que a TC dos resistentes foi 15% superior quando comparado ao suscetível. Alterações na TC podem expressar maior capacidade competitiva e em melhor estabelecimento das plantas (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2005).

Para a variável TCR, foi observado que os biótipos apresentaram comportamento similar e decrescente ao longo do período avaliado (Fig. 15). Resultados semelhantes foram obtidos em *K. scoparia* (L.) Roth resistente a herbicidas da ALS onde houve diferenças na TCR (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE, 1997).

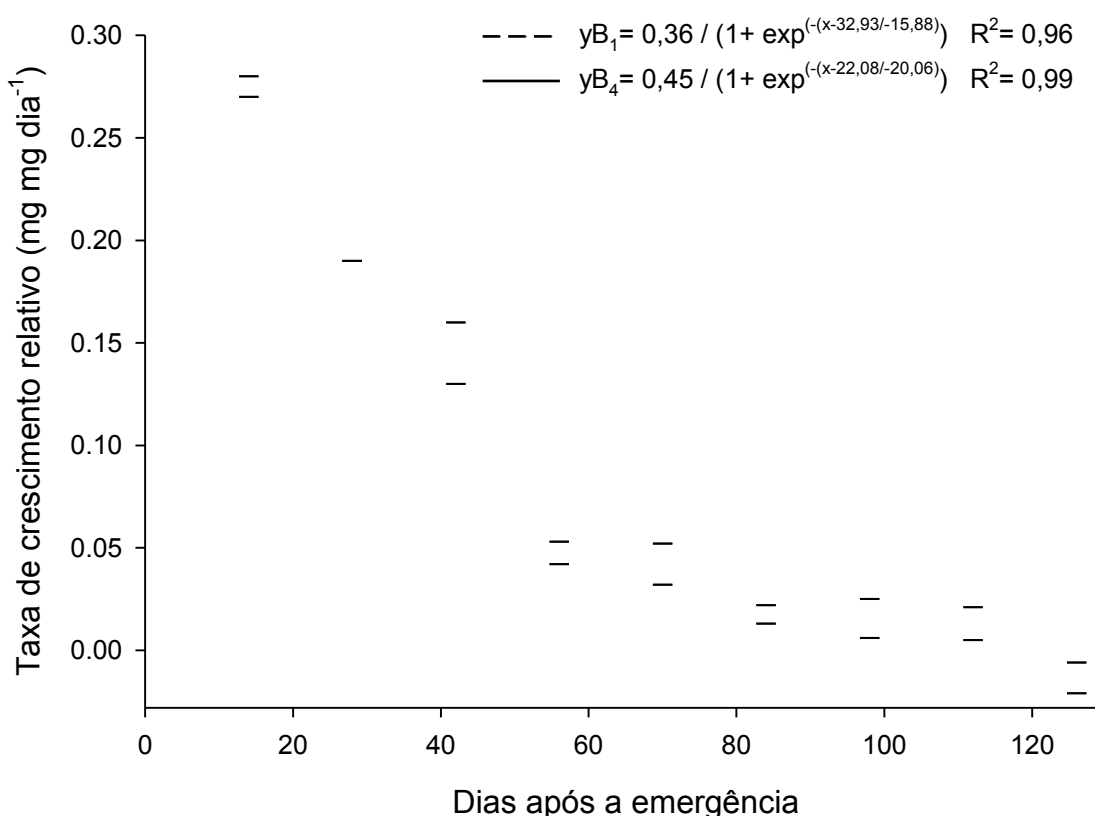


Figura 15- Taxa de crescimento relativo de biótipos de nabo suscetível (B₁) e resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, avaliado dos 14 aos 126 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. Os pontos representam os valores médios das repetições dos biótipos e, as barras, representam a diferença mínima significativa ($p < 0,05$)

A ausência de diferenças na TCR é um indicativo que os biótipos apresentam produtividade e capacidade competitiva semelhante (VIDAL; TREZZI, 2000). Plantas daninhas que apresentam elevada TCR podem levar vantagem

ecológica, pois ocupam o espaço de forma mais rápida (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007). Com o aumento da massa seca acumulada pelas plantas, ocorre aumento na necessidade de fotoassimilados para a manutenção das estruturas já formadas, assim, a quantidade de fotoassimilados disponível para o crescimento tende a ser menor e, conseqüentemente, a TCR decrescer com o tempo (BENINCASA, 2003).

Comparando os biótipos em relação as suas principais características reprodutivas, percebe-se que o número de flores remanescentes, o número de siliquis o número de sementes produzidas por planta não diferiram entre os biótipos avaliados (tab. 21).

Tabela 21- Número de flores por planta (NFP), número de siliquis por planta (NSP) e número de sementes por planta de *Raphanus sativus* L. (nabo) suscetível (B₁) e resistentes (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico, em resposta ao fator biótipo. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2015.

Biótipo	Número flores planta ⁻¹	Número de siliquis planta ⁻¹	Número de sementes planta ⁻¹
B ₁ (suscetível)	23 ^{ns}	209 ^{ns}	778 ^{ns}
B ₄ (Resistente)	28	199	482
C.V. (%)	32,2	42,3	30,2

*^{ns} = médias das colunas não diferem entre si pelo Teste de t ($p \leq 0,05$).

Em estudos de valor adaptativo em biótipos de *R. raphanistrum* L. não foram diagnosticadas diferenças na produção de flores e nem no número de sementes por planta (ROLES; CONNER, 2008). Resultados semelhantes foram obtidos em biótipos de *Alopecurus myosuroides* Huds. resistentes a herbicidas inibidores da ACCase onde não houve diferença na produção final de sementes (DARMENCY et al., 2015). Para Vila-Aiub, Neve e Powles (2009a) a produção de sementes é um dos fatores que auxiliam no entendimento de como a resistência impacta os processos do ciclo de vida de plantas daninhas resistentes e suscetíveis, podendo ser aplicado no manejo eficiente das mesmas.

O conhecimento destas variáveis é importante já que a evolução da resistência pode resultar em custos adaptativos, interferindo no sucesso evolutivo do genótipo com base na capacidade competitiva, na sobrevivência e na reprodução. Em geral, diversos estudos reportaram não haver custos adaptativos para biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS quando comparados com plantas suscetíveis (CHRISTOFFOLETI, 2001; SIBONY, RUBIN, 2003; YU; HAN;

VILA-AIUB, 2010; LAMEGO et al., 2011; DAL MAGRO et al., 2011; LI et al., 2013; DARMENCY et al., 2013).

A ausência de custos adaptativos observada na maioria dos casos de espécies daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS é, certamente, um dos fatores que contribui para a rápida evolução e dispersão da resistência a esse mecanismo em todo o mundo (LI et al., 2013).

4.4 Conclusões

O biótipo de *Raphanus sativus* L. resistente (B₄) a herbicidas da enzima ALS não apresenta custos adaptativos quando comparados com o biótipo suscetível (B₁).

5. CONCLUSÕES

O biótipo de *Raphanus sativus* L. B₁ é suscetível ao herbicida iodosulfurom-metílico enquanto os biótipos B₄ e B₁₃ são resistentes, sendo necessário, aos 28 DAA, doses 89 e 252 vezes superiores para obter C₅₀ e, doses de 935 e 789 superiores para obter o GR₅₀, respectivamente, quando comparados com o biótipo suscetível.

Os herbicidas alternativos glufosinato de amônio, paraquate, diurom+paraquate, glifosato, saflufenacil, metribuzim, bentazona, 2,4-D amina, mesotriona, tembotriona, atrazina e fomesafem controlaram de forma excelente os biótipos resistentes (B₄ e B₁₃) e o biótipo suscetível (B₁).

Os herbicidas metsulfurom-metílico, nicosulfurom, clorimurom-etílico, imazetapir, cloransulam-metílico, bispiribaque sódico e flucarbazona sódio controlam biótipos de *R. sativus* L. suscetível, porém não controlam os biótipos resistentes (B₄ e B₁₃), evidenciando a existência de resistência cruzada, sendo necessário a utilização de herbicidas com mecanismo de ação distinto para controlá-los.

O K_m da enzima ALS dos biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes (B₄ e B₁₃) e do suscetível (B₁) ao herbicida iodosulfurom-metílico são semelhantes e, o V_{máx} da enzima ALS dos biótipos resistentes é superior àquele observado para enzima ALS do biótipo suscetível.

A resistência dos biótipos de nabo resistentes (B₄ e B₁₃) é decorrente da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida iodosulfurom-metílico devido à mutação identificada na posição 574 do gene resultando na substituição dos aminoácidos Triptofano por Leucina (Trp₅₇₄-Leu).

Os biótipos de *Raphanus sativus* L. resistentes não apresentam metabolização diferencial do herbicida iodosulfurom-metílico através do complexo enzimático da

P₄₅₀ monooxygenase, porém a utilização do iodosulfurom-metílico+malathion possibilitou melhor controle no B₁₃ com redução da MMSPA.

O biótipo de *Raphanus sativus* L. resistente (B₄) ao herbicida iodosulfurom-metílico não apresentam custos adaptativos quando comparados com o biótipo suscetível (B₁).

6. REFERÊNCIAS

AGOSTINETTO, D.; TIRONI, S.P.; GALON, L.; MAGRO, T.D. Desempenho de formulações e doses de glyphosate em soja transgênica. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.3, n.2, p.36, 2009.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofitcons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22nov. 2014.

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.

AHRI - Australian Herbicide Resistance Initiative. **Is there a fitness penalty in group B resistant weeds, 2013**. Disponível em: <http://ahri.uwa.edu.au/is-there-a-fitness-penalty-in-group-b-resistant-weeds/> Acesso em: 06dez de 2014.

ALCOCER-RUTHLING, M.; THILL, D.C.; SHAFII, B. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, v.6, n.2, p.303-309, 1992.

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

ASHIGH, J.; 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.

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

AVILA, L. A.; LEE, D.J.; SENSEMAN, S.A.; MCCAULEY, G.N.; CHANDLER, J.M.; COTHERN, J.T. Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp) and imidazolinone tolerant/resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management Science**, v.61, n.2, p.171-178, 2005.

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

BECKIE, H. J.; 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.

BERGELSON, J.; PURRINGTON, C.B. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. **The American Naturalist**, v.148, n.3, p.536-558, 1996.

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

BOHM, G.M.B.; SCHENEIDER, L.; CASTILHOS, D.; AGOSTINETTO, D.; ROMBALDI, C. V. Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolism microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.3, p.919-930, 2011.

BOZ, O. Economic threshold for wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) control in wheat fields. **Turk Journal Agricultural Forestry**, v.29, n.3, p.173-177, 2005.

BOZIC, D.; SARIC, M.; MALIDZA, G.; RITZ, C.; VRBNICANIN, S. Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. **Crop Protection**, v.39, n.1, p.1-10, 2012.

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

BRIGHENTI, A.M.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E.; ADEGAS, F.S.; VAL, W.M.C. Análise de crescimento de biótipos de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.19, n.1, p.51-59, 2001.

BRIGHENTI, A.M.; SILVA, J.F.; LOPES, N.F. Crescimento e partição de assimilados em losna. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.1, p.41-45, 1993.

BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; STREIBIG, J.C.; DAVIS, V.M.; SHANER, D.; NORSWORTHY, J.K.; RITZ, J. Review: Confirmation of Resistance to Herbicides and Evaluation of Resistance Levels. **Weed Science**, v.61, n.1, p.4-20, 2013.

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

CARVALHO, L.B. de. **Herbicidas**. Lages-SC: Edição do Autor, 2013. 72p.

CHEN, M.; YANG, H.; LIN, X.; CHEN, Y.; WANG, M.; LIU, J. DFT Study of Binding Energies between Acetohydroxyacid Synthase and its Sulfonylurea Inhibitors: An Application of Quantum Pseudoreceptor Model. **Communications in Computational Chemistry**, v.1, n.1, p.72-87, 2013.

CHRISTOFFERS, M. J.; NANDULA, V. K.; HOWATT, K. A.; WEHKING, T. R. Target site resistance to acetolactase synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapsis arvensis*). **Weed Science**, v.54, n.2, p.191-197, 2006.

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.

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.

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

COSTA, L.O.; RIZZARDI, M.A. Resistance of *Raphanus raphanistrum* to the herbicide metsulfuron-methyl, **Planta Daninha**, v.32, n.1, p.181-187, 2014.

COSTA, Leandro Oliveira da. Resistência de *Raphanus raphanistrum* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS). 2013. 114f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária- Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

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.

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

DARMENCY, H. Pleiotropic effects of herbicide-resistance genes on crop yield: a review. **Pest Management Science**, v.69, n.8, p.897-904, 2013.

DARMENCY, H.; MENCHARI, Y.; LE CORRE, V.; DÉYLE, C. Fitness cost due to herbicide resistance may trigger genetic background evolution. **Evolution**, v.45, n.1, p.271-278, 2015.

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

DÉYLE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v.69, n.2, p.176-187, 2013b.

DÉYLE, 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, 2013c.

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

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L., A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987.

DUARTE, N. F.; SILVA, J.B.; SOUZA, I.F. Competição de plantas daninhas com a cultura do milho no município de Ijaci, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.5, p.983-992, 2002.

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.

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

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.

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

ESLAMI, S. V.; GILL, G.S.; BELLOTTI, B.; MCDONALD, G. Wild radish (*Raphanus raphanistrum*) interference in wheat. **Weed Science**, v.54, n.4, p.749-756, 2006.
FAO. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em 05jan de 2015.

FARINELLI, R.; PENAROL, F.G.; LEMOS, L.B. Eficiência do herbicida 2,4-D no controle de *Raphanus sativus* L., em pós-emergência na cultura de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.1, p.104-111, 2005.

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.

FLECK, N.G.; BIANCHI, M.A.; RIZZARDI, M.A.; AGOSTINETTO, D. Interferência de *Raphanus sativus* sobre cultivares de soja durante a fase vegetativa de desenvolvimento da cultura. **Planta Daninha**, v.24, p.425-434, 2006.

FLECK, N.G.; LAMEGO, F.P.; SCHAEGLER, C.E.; FERREIRA, F.B. Resposta de cultivares de soja à competição com cultivar simuladora da infestação de plantas concorrentes. **Scientia Agraria**, v.8, n.3, p.213-218, 2007.

FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N. D. (Ed.). **Research methods in weed science**. 3.ed. Champaign: Southern Weed Science

GENBANK. **Banco de Genes da National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ344986.1> Acesso em: 15dez de 2014.

GERWICK, B.C.; MIRELES, L.C.; EILERS, R.J. Rapid diagnosis of ALS/AHAS inhibitor herbicide resistant weeds. **Weed Technology**, v.7, n.2, p.519-524, 1993.

HALL, L.M.; DEVINE, M.D. Cross-resistance of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Stellaria media* to a triazopyrimidine herbicide. **Plant Physiology**, v.93, n.3, p.962-966, 1990.

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

HAN, H.; YU, Q.; VILA-AIUB, M.; POWLES, S.B. Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. **Crop Protection**, v.65, n.11, p.57-63, 2014.

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

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

HEAP, I. **International Survey of Herbicide resistant Weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.org> Acesso em: 10mar de 2015.

IWAKAMI, S.; WATANABE, H.; MIURA, T.; HIROSHI MATSUMOTO, H.; UCHINO, A. Occurrence of sulfonylurea resistance in *Sagittaria trifolia*, a basal monocot species, based on target-site and non-target-site resistance. **Weed Biology and Management**, v.14, n.1, p.43-49, 2014a.

IWAKAMI, S.; UCHINO, A.; KATAOKA, Y.; HIROYUKI, S.; WATANABE, H.; INAMURA, T. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, v.70, n.4, p.549-558, 2014b.

JUGULAM, M.; DIMEO, N.; VEDHUIS, L.J.; WALSH, M.; HALL, J.C. Investigation of MCPA (4-Chloro-2-ethylphenoxyacetate) resistance in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.12, p.12516-12521, 2013.

KISSMANN, K.G.; **Plantas infestantes e nocivas**. TOMO II. 3.ed. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 2007. CD-ROM.

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.

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

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**. São Paulo: EDUSP, v.1, p.331-350, 1979.

MALIK, Mayank Singh. Biology and ecology of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). 2009. 175f. **Dissertation** (Doctor of Philosophy Plant and Environmental Sciences) - Graduate School of Clemson University, Clemson.

- MARIANI, Francieli. Caracterização de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). 2014. 112f. **Tese** (Doutorado em Fitossanidade) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel- Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão.
- MATZENBACHER, Felipe de Oliveira. Caracterização e controle de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas e quinclorac em arroz irrigado. 2012. 212f. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 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.
- MENCHARI, Y.; CHAUVEL, B.; DARMENCY, H.; DÉLYE, C. Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. **Journal of Applied Ecology**, v.45, n.3, p.939-947, 2008.
- MICHELON, M.F.; DAL MAGRO, T.; MARCHIORETTO, L.R.; VARGAS, L.; CONTE, E.D. Alternativas de controle de biótipos de *Raphanus sativus* resistente ao herbicida metsulfuron-methyl. In: **Anais do XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**, Campo Grande, MS, 2012.
- MILDER, L.J.; READE, J.P.H.; COBB, A.H. The effect of temperature on glutathione S-transferase activity and glutathione content in *Alopecurus myosuroides* (black grass) biotypes susceptible and resistant to herbicides. **Weed Research**, v.47, p.106-112, 2007.
- MONJARDINO, M.; PANNELL, D.J.; POWLES, S.B. Multispecies resistance and integrated management: abioeconomic model for integrated management of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*), **Weed Science**, v.51, n.5, p.798-809, 2003.
- MUZILLI, O. Manejo da matéria orgânica no sistema plantio direto: a experiência no Estado do Paraná. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n.100, p.6-10, 2002.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Enzimas. In: **Lehninger- Princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: SARVIER, 2006, p.189-224.
- NEWELL, S.J. Does herbicide resistance have a cost in *Brassica rapa*? **The American Biology Teacher**, v.68, n.9, p.530-535, 2006.
- NORSWORTHY, J.K. Allelopathic potential of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Technology**, v.17, n.2, p.307-313, 2003.
- OERKE, E.C. Crop loss to pests. **Journal of Agricultural Science**, v.144, n.1, p.31-43, 2006.

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

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

PONTZEN, R. Propoxycarbazone-sodium (BAY MKH 6561): systemic properties and basis of selectivity in wheat, **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer**, v.55, n.1, p.37-52, 2002.

POWLES, S. B.; HOWAT, J. A. M. **Herbicides resistance in plants: biology and biochemistry**. New York: CCR Press, 1990. 353p

POWLES, S.B., YU, Q. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, n.61, n.4, p.317-347, 2010.

POWLES, S.B.; PRESTON, C. **Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants**. Disponível em: <http://www.hracglobal.com/Publications/HerbicideCrossResistanceandMultipleResistance.aspx>. Acesso em: 14 de outubro 2014.

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

RADFORD, P.J. Growth analysis formulae – their use and abuse. **Crop Science**, v.7, n.3, p.171-175, 1967.

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.

REIS, G.G.; MULLER, M.W. **Análise de crescimento de plantas - mensuração do crescimento**. Belém, CPATU, 1978. 35p.

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

RIGOLI, R.P.; AGOSTINETTO, D.; VAZ DA SILVA, J.M.B.; FONTANA, L.C.; VARGAS, L. Potencial competitivo de cultivares de trigo em função do tempo de emergência. **Planta Daninha**, v.27, n.1, p.41-47, 2009.

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

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina, 2005. 592p.

ROLES, A.; CONNER, J.K. Fitness effects of mutation accumulation in a natural outbred population of Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*): Comparison of field and greenhouse environments. **Evolution**, v.62, n.5, p.1066-1075, 2008.

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

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.; 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.

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

SCHAEDLER, 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.

SCHMITZER, P.R.; EILERS, R.J.; CSÉKE, C. Lack of cross-resistance of imazaquin resistant *Xanthium strumarium* acetolactate synthase to flumetsulam and chlorimuron. **Plant Physiology**, v.103, n.1, p.281-283, 1993.

SCHNEIDER, T.C.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Potencial alelopático do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) sobre o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) e aveia preta (*Avena strigosa* Scherb). **Revista Thêma et Scientia**, v.2, n.1, p.151-156, 2012.

SCOTT, H.D.; BATCHELOR, J.T. Dry weight and leaf area production rates of irrigated determinate soybeans. **Agronomy Journal**, v.71, n.5, p.776-782, 1979.

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. 458p.

SEQUENCHER. Sequence analysis software, Version 5.1, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA. Disponível em: <http://www.genecodes.com>

SHANER, D.L.; ANDERSON, P.C.; STIDHAM, M.A. Imidazolinones-potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase, **Plant Physiology**, v.76, n.10, p.545-546, 1984.

SIBONY, M., RUBIN, B. 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 12.0, 2012.

SILVA, P.R.F.; ARGENTA, G.; SANGOI, L.; STRIEDER, M.L.; SILVA, A.A. Estratégias de manejo de coberturas de solo no inverno para cultivo do milho em sucessão no sistema semeadura direta. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.1011-1020, 2006.

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.

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, p.144, 2004.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAN, M.K.; MEDD, R.W. Characterisation of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. **Plant Science**, v.163, n.2, p.195-205, 2002.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide tolerant crops, **Amino Acids**, v.30, n.2, p.195-204, 2006.

TANAKA, Y. Properties of acetolactate synthase from sulfonylurea-resistant *Scirpus juncooides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.77, n.1, 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.

THEISEN, G. **Aspectos botânicos e relatos de resistência de nabo silvestre aos herbicidas inibidores de ALS**: Embrapa Clima Temperado, 2008. 26p. Documentos 239. Disponível em : <<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/pdo239.htm>.> Acesso em: 20jul. 2013.

THEISEN, G. Identificação de nabo (*Raphanus sativus*) resistente aos herbicidas inibidores de ALS. **Boletim Informativo da SBCPD**, São Paulo: SBCPD, v.10, supl. p.262, 2004.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R.; HEAP, I.M. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Online em <http://www.weedscience.com> acesso em 05jan de 2015.

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

TRUCCO, F.; HAGER, A.G.; TRANEL, P.J. Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. **Journal of Plant Physiology**, v.163, n.4, p.475-479, 2006.

VARGAS, L.; ULGUIM, A.R.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T.D.; THÜRMER, L. Low level resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to glyphosate in Rio Grande Do Sul-Brazil. **Planta Daninha**, v.31, p.677-686, 2013.

VARGAS L.; NOHATTO, M.A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M.A.; NEGRETTI, R.R.D.; BERTO, R.M. Resposta de biótipos de *Raphanus* spp. a herbicidas inibidores da ALS. In: **Anais do XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**, Ribeirão Preto, SP, 2010.

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.

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

VARGAS, L.; 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.; 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.

VENCILL, W.K.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; SOTERES, J.K.; MALLORYSMITH, 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.

VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Análise de risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.15, n.12, p.152-161, 1997.

VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Análise de crescimento de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.18, n.3, p.427-433, 2000.

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, 2009a.

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, 2009b.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. **New Phytologist**, v.167, n.3, p.787-796, 2005.

VITORINO, H.S.; CAMPOS, C.F.; MARTINS, D. Eficácia de herbicidas na dessecação de nabiça e sua ação na germinação de sementes, **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.3, p.1119-1128, 2014.

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

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

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

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

WEST, C.; BRIGGS, G.E.; KIDD, F. Methodos and significant relations in the quantitative analysis of planta growth. **New Physiologist**, v.19, n.7, p.200-207, 1920.

YASUOR, H.; OSUNA, M.D.; ORTIZ, A.; SALDAÍN, N.E.; ECKERT, J.W.; FISCHER, A.J. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass (*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3653-3660, 2009.

YU, Q.; POWLES, S.B. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: A threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, v.166, n.3, p.1106-1118, 2014a.

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

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

YU, Q.; HAN, H.; 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.; FRIESEN, S.L.J.; ZHANG, X.Q.; POWLES, S.B. Tolerance to acetolactate synthase and acetyl-coenzyme a carboxylase inhibiting herbicides in *Vulpia bromoides* is conferred by two co-existing resistance mechanisms. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.78, n.1, p.21-30, 2004.

YU, Q.; HASHEM, A.; WALSH, M.J.; POWLES, S.B. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science Society of America**. v.51, n.6, p.831-838, 2003.

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

VITA

Joanei Cechin é filho de João Batista Cechin e Neuza Maria Fontana Cechin. Nasceu em 03 de abril de 1985, no Município de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Concluiu no ano de 1999, o ensino fundamental na Escola Estadual Integrada de 1º Grau Arroio Grande em Santa Maria/RS. Neste período, foi agraciado como um dos melhores alunos da Escola com reconhecimento concedido no ano de 1995. Em 2000, iniciou os estudos na Escola Estadual de Educação Básica Bom Conselho em Silveira Martins/RS onde se formou no ano de 2002. No ano de 2003, ingressou no curso de Técnico Agrícola habilitação em Agropecuária no Colégio Agrícola de Santa Maria pertencente à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde graduou como Técnico Agrícola em 2005. No ano de 2007, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria onde graduou no ano de 2012. No período de 2008 a 2012, foi bolsista de Iniciação Científica (PRAE/UFSM e PIBIC/CNPq) onde desenvolveu atividades de pesquisa com estudos voltados a propagação *in vitro* e *ex vitro* de espécies vegetais e no manejo de plantas daninhas nas culturas da soja, arroz e cereais de inverno. Em 2013, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, em Capão do Leão/RS.