

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**



**Tese**

**Identificação e caracterização de biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas  
inibidores da enzima HPPD**

**Maicon Fernando Schmitz**

**Pelotas, 2022**

**Maicon Fernando Schmitz**

**Identificação e caracterização de biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas  
inibidores da enzima HPPD**

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

Orientador: Dr. Leandro Vargas

Coorientador (es): Dr. Dirceu Agostinetto;  
Dr. Edinalvo Rabaioli Camargo;  
Dr. Luciano do Amarante.

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S355i Schmitz, Maicon Fernando

Identificação e caracterização de biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da enzima HPPD / Maicon Fernando Schmitz ; Leandro Vargas, orientador. — Pelotas, 2022.

138 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. *Euphorbia heterophylla*. 2. Tembotrione. 3. Expressão gênica. 4. Metabólitos. 5. Atividade antioxidante. I. Vargas, Leandro, orient. II. Título.

CDD : 632.58

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Maicon Fernando Schmitz

Identificação e caracterização de biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da enzima HPPD

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (área de conhecimento: Herbologia), Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 23 de junho de 2022.

Banca examinadora:

Eng. Agr. Dr. Leandro Vargas (Orientador)

Pesquisador da Embrapa Trigo

Eng. Agr. Dr. Dirceu Agostinetto (Coorientador)

Professor da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel

Eng. Agr. Dr. André Andres

Pesquisador da Embrapa Clima Temperado

Eng. Agr. Dr. Sidnei Deuner

Professor do Instituto de Biologia/Departamento de Botânica/UFPel

Dra. Bianca Camargo Aranha

Pós-doc do Centro de Herbologia (CEHERB/FAEM/UFPel)

**Dedico este trabalho a meus pais Celso e Odênia, minha companheira Bruna, meus irmãos, colegas e amigos.**

## **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 da Fronteira Sul, pela formação acadêmica e pessoal, mas além disso, pelo ambiente propício para o início da minha jornada como pesquisador.

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.

Ao professor Dr. Dirceu Agostinetto por toda ajuda e coorientação, a todos os ensinamentos, conselhos, incentivo, amizade e confiança proporcionados.

Aos professores Dr. Luis Antonio de Avila e Dr. Edinalvo Rabaioli Camargo pela amizade, convívio e ensinamentos.

Aos pós-doc Dr<sup>a</sup> Vívian Ebeling Viana, Dr. Marcus Vinícius Fipke e Dr<sup>a</sup> Bianca Camargo por disponibilizar do seu tempo e expertise para auxílio nas atividades de biologia molecular e quantificação de tembotrione via cromatografia líquida de alta performance.

A doutoranda Thais Stradioto Melo pelo auxílio na quantificação de fluorescência da clorofila.

Aos colegas de mestrado e doutorado: Adriana do Amarante, Andrés Monge Vargas, Andressa Pitol, Cassiano Salin Pigatto, Francisco Goulart, Geovana Facco Barbieri, Jaqueline Schmitt, Joanei Cechin, Joao Goebel, Joseano Graciliano, Juliano Gazola, Laís Tessari Perboni, Matheus Bastos Martins, pela amizade, incentivo e auxílio na execução dos experimentos.

Aos bolsistas e estagiários, do Centro de Estudos em Herbologia (CEHERB) Leandro Souza, Lucas Paniz Pinho, Richard Quevedo, Tulio Dahmer, Renan de

Oliveira Pereira e Katharina Wickboldt, pela amizade, incentivo, momentos de convívio e auxílio na execução dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado.

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

A todos meu eterno agradecimento e a certeza de que foram essenciais durante essa jornada acadêmica.

*A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.*

*Albert Einstein*

## Resumo

SCHMITZ, Maicon Fernando. **Identificação e caracterização de biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da enzima HPPD**. 2022. 138f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A leiteira (*Euphorbia heterophylla*) é uma das principais plantas daninhas de difícil controle encontrado nas culturas de verão, devido aos aspectos intrínsecos de competitividade da espécie, aliada à ocorrência de biótipos resistentes. Estudos de curva dose-resposta demonstraram controle insatisfatório de alguns biótipos pela aplicação de inibidores da hidroxifenil piruvato dioxigenase (HPPD), sugerindo a ocorrência de biótipos resistentes. Desse modo, os objetivos deste trabalho foram identificar e caracterizar a resistência de leiteira, elucidar os mecanismos de resistência, verificar as alterações do metabolismo vegetal e caracterizar a herança da resistência de *Euphorbia heterophylla* aos herbicidas inibidores da HPPD. Para tal, foram realizados uma série de estudos que foram enquadrados em quatro capítulos, nos quais foram executados no período de março de 2018 a abril de 2022, em casa de vegetação e laboratórios da Universidade Federal de Pelotas. Inicialmente, as sementes coletadas em diferentes regiões do RS foram avaliadas quanto à resistência ao herbicida tembotrione, sendo construídos mapas de controle, curvas de dose-resposta, averiguação da resistência cruzada e controle alternativo (capítulo 1). Para elucidar os mecanismos de resistência envolvidos, foram realizados estudos de absorção, translocação, metabolismo e identificação dos metabólitos conhecidos de tembotrione, bem como, o efeito da inibição das enzimas P450 sob exposição ao herbicida tembotrione e a quantificação da expressão do gene HPPD (capítulo 2). Para verificar as alterações no metabolismo vegetal entre os biótipos, foram quantificados aspectos relacionados a fotossíntese, fluorescência da clorofila, pigmentos, integridade celular e atividade de enzimas antioxidantes (capítulo 3). O modo e tipo de herança da resistência foi determinada para os biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da HPPD (capítulo 4). Os resultados demonstraram que o biótipo 32.2 apresenta resistência múltipla aos inibidores da HPPD e Protox e o biótipo 32.1 apresenta resistência múltipla a HPPD, Protox e ALS. Os pré-emergentes atrazina, flumioxazina e sulfentrazone e os pós-emergentes atrazina, paraquat, paraquat+diuron, saflufenacil, glifosato e amônio glufosinato demonstraram controle satisfatório de todos os biótipos de leiteira. Os biótipos de leiteira resistentes aos inibidores da HPPD apresentam como mecanismo de resistência a rápida metabolização do herbicida tembotrione, para um metabolito atóxico denominado de TCMBA, sendo que não foram observadas respostas diferenciais entre os biótipos quanto a absorção, inibição das P450 e expressão do gene HPPD. O incremento da exposição do biótipo suscetível ao tembotrione resulta em rápido aumento da F0 e redução acentuada de Fm e Fv/Fm, em comparação aos biótipos resistentes. Os biótipos resistentes aos inibidores da HPPD demonstram menor declínio das variáveis fotossintéticas (A, Gs, E, CE e EUA), além de, menor incremento da Ci, em relação ao biótipo suscetível, no decorrer do período de exposição ao herbicida tembotrione. O incremento do período de exposição ao herbicida tembotrione acarretou no aumento significativo de estresse oxidativo no biótipo suscetível em comparação aos resistentes, evidenciado pelo aumento de

TBARs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, extravasamento celular e menor conteúdo de carotenoides. A maior atividade da APX 96 horas após a aplicação de tembotrione, nos biótipos resistentes acarretou menores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menores danos aos componentes celulares. A herança da resistência ao herbicida tembotrione é complexa, sendo codificada por genes nucleares de dominância incompleta. Os heterozigotos possuem sensibilidade intermediária ao herbicida tembotrione, onde a F1 R♂ x S♀ apresenta comportamento mais próximo ao genitor suscetível, e a F1 S♂ x R♀ mais próxima ao genitor resistente.

Palavras-chave: *Euphorbia heterophylla*, tembotrione, expressão gênica, metabólitos, atividade antioxidante, herança da resistência.

## Abstract

SCHMITZ, Maicon Fernando. **Identification and characterization of wild poinsettia biotypes with resistance to HPPD inhibitors**. 2022. 138p. Thesis (Thesis in Crop Protection) - Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) is one of the main troublesome weed of summer crops, due to the intrinsic aspects of competitiveness, combined with the occurrence of resistant biotypes. Dose-response curve studies demonstrated unsatisfactory control of some biotypes by hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitors, suggesting the occurrence of resistant biotypes. Thus, the objectives of this work were to identify and characterize wild poinsettia resistance, elucidate resistance mechanisms, verify changes in plant metabolism and characterize the inheritance of resistance of *Euphorbia heterophylla* to HPPD-inhibiting herbicides. To this end, a series of studies were carried out that were framed in four chapters, in which they were carried out from March 2018 to April 2022, in a greenhouse and laboratories at the Federal University of Pelotas. Initially, seeds collected in different regions of Rio Grande do Sul state were evaluated for resistance to the herbicide tembotrione, and control maps, dose-response curves, cross-resistance investigation and alternative control were carried out (chapter 1). To elucidate the mechanisms of resistance involved, studies of absorption, translocation, metabolism and identification of known metabolites of tembotrione were evaluated, as well as the effect of inhibition of P450 enzymes under exposure to the herbicide tembotrione and the quantification of the expression of the HPPD gene (chapter two). To verify the changes in plant metabolism between the biotypes, aspects related to photosynthesis, chlorophyll fluorescence, pigments, cellular integrity and activity of antioxidant enzymes were quantified (chapter 3). The mode and type of inheritance of resistance was determined for the wild poinsettia biotypes resistant to the HPPD-inhibiting herbicides (chapter 4). The results showed that biotype 32.2 presents multiple resistance to HPPD and PPO inhibitors and biotype 32.1 presents multiple resistance to HPPD, PPO and ALS. The pre-emergent atrazine, flumioxazin and sulfentrazone and the post-emergent atrazine, paraquat, paraquat+diuron, saflufenacil, glyphosate, ammonium glufosinate demonstrated satisfactory control of all wild poinsettia biotypes. Wild poinsettia biotypes resistant to HPPD inhibitors present as a mechanism of resistance the rapid metabolism of the herbicide tembotrione, to a non-toxic metabolite called TCMBAs, and no differential responses were observed between biotypes regarding absorption, P450 inhibition and HPPD gene expression. The increase in exposure of the susceptible biotype to tembotrione results in a rapid increase in F<sub>0</sub> and a marked reduction in F<sub>m</sub> and F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, compared to resistant biotypes. Biotypes resistant to HPPD inhibitors show a smaller decline in photosynthetic variables (A, G<sub>s</sub>, E, CE and iWUE), in addition to a smaller increase in C<sub>i</sub>, in relation to the susceptible biotype, during the period of exposure to the herbicide tembotrione. The increase in the period of exposure to the herbicide tembotrione resulted in a significant increase in oxidative stress in the susceptible biotype compared to the resistant ones, as evidenced by the increase in TBARs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cellular extravasation and lower carotenoid content. The higher activity of APX 96 hours after application of tembotrione, in resistant biotypes resulted in lower levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and less damage to cellular components. The inheritance of tembotrione herbicide resistance is complex, being encoded by incompletely dominant nuclear

genes. Heterozygotes have intermediate sensitivity to the herbicide tembotrione, where F1 R♂ x S♀ has a behavior closer to the susceptible parent, and F1 S♂ x R♀ is closer to the resistant parent.

Keywords: *Euphorbia heterophylla*, tembotrione, gene expression, herbicide metabolism, antioxidant activity, resistance inheritance.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Localização geográfica dos municípios onde foram coletados biótipos de *Euphorbia heterophylla* na safra 2017/18. Rio Grande do Sul-RS, 2018.....36
- Figura 2 Localização geográfica dos biótipos de *Euphorbia heterophylla*. Pontos verdes representam controle entre 79-100%, amarelos 58-78% e vermelhos inferiores a 49%, em função da aplicação de 100,8 g ha<sup>-1</sup> do herbicida tembotrione. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2019.....41
- Figura 3 Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a tembotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2019. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).....45
- Figura 4 Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a tembotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2019. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ) .....46
- Figura 5 Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a mesotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ) .....47

- Figura 6 Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a mesotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ) .....47
- Figura 7 Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a Isoxaflutole, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ) .....49
- Figura 8 Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a isoxaflutole, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ) .....50
- Figura 9 Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em função da aplicação fomesafem, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....51
- Figura 10 Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) expostos a fomesafem, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....52
- Figura 11 Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em função da aplicação imazetapir, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância .....53
- Figura 12 Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) expostos a imazetapir, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As

	barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....	54
Figura 13	Fórmula estrutural de tembotrione e seus principais metabólitos monitorados nos biótipos de leiteira as 48h após a aplicação de tembotrione. * M8 não foi desenhado pois é a forma reduzida de M7 e se desconhece o local exato onde está localizada a dupla ligação resultante da perda de dois átomos de hidrogênio. Capão do Leão, RS, 2022.....	68
Figura 14	Absorção de tembotrione (%) pelos biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.....	72
Figura 15	Tembotrione $\mu\text{g por g}^{-1}$ de tecido vegetal da folha tratada dos biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.....	74
Figura 16	Tembotrione $\mu\text{g por g}^{-1}$ nas folhas acima da tratada nos biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.....	75
Figura 17	Tembotrione $\mu\text{g por g}^{-1}$ nas folhas abaixo da tratada nos biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.....	76
Figura 18	Cromatogramas de UHPLC mostrando tembotrione e os principais metabólitos observados nos biótipos de leiteira suscetível 10.1 (A) e resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C), avaliados as 48 horas após o tratamento na folha tratada. Capão do Leão, RS, 2022.....	77
Figura 19	Cromatogramas de UHPLC mostrando tembotrione e os principais metabólitos observados nos biótipos de leiteira suscetível 10.1 (A) e resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C), avaliados as 48 horas após o tratamento nas folhas acima da tratada. Capão do Leão, RS, 2022.....	78
Figura 20	Cromatogramas de UHPLC mostrando tembotrione e os principais metabólitos observados nos biótipos de leiteira suscetível 10.1 (A) e	

	resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C), avaliados as 48 horas após o tratamento nas folhas abaixo da tratada. Capão do Leão, RS, 2022.....	79
Figura 21	Estruturas químicas de tembotrione e dos metabólitos detectados nos biótipos de leiteira (10.1, 32.1 e 32.2), esquematizados de acordo com suas prováveis vias de detoxificação. Tembotrione é mostrado em contorno laranja, enquanto os metabólitos intermediários M3/M4 e M5 são mostrados sem contorno. O principal metabólito (M2) encontrado nos biótipos resistentes (32.1 e 32.2) é mostrado em contorno verde. Capão do Leão, RS, 2022.....	81
Figura 22	Controle (%) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida tembotrione com inibidores da P450 malathion e butóxido de piperonila. Capão do Leão, RS, 2022. T: tembotrione; M: malathion; P: butóxido de piperonila.....	83
Figura 23	Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida tembotrione com inibidores da P450 malathion e butóxido de piperonila. Capão do Leão, RS, 2022. T: tembotrione; M: malathion; P: butóxido de piperonila.....	84
Figura 24	Expressão do gene HPPD relativa a $\beta$ tubulina e 18S rRNA em <i>Euphorbia heterophylla</i> suscetível (10.1) e resistente (32.1 e 32.2) aos herbicidas inibidores da hidroxifenil piruvato dioxigenase, as 12, 24 e 48 horas após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). As diferenças não foram significativas entre biótipos para cada período de coleta (P < 0,05). Os dados foram agrupados de três experimentos (n:18). As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância (p $\geq$ 0,95). Capão do Leão, RS, 2022.....	86
Figura 25	Fluorescência inicial (F0) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância .....	94

- Figura 26 Fluorescência máxima (Fm) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....96
- Figura 27 Rendimento quântico máximo do FSII (Fv/Fm) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....97
- Figura 28 Fotossíntese líquida (A) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....98
- Figura 29 Concentração de CO<sub>2</sub> subestomática (Ci) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância .....99
- Figura 30 Condutância estomática (Gs) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....100
- Figura 31 Taxa de transpiração (E) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....101
- Figura 32 Eficiência da carboxilação (CE) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão,

	RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....	102
Figura 33	Eficiência do uso da água (EUA) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância .....	103
Figura 34	Clorofila total de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância .....	105
Figura 35	Carotenoides de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância .....	106
Figura 36	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....	107
Figura 37	Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.....	108
Figura 38	Extravasamento celular de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ). Capão do Leão, RS, 2021. UA= unidade ativa.....	109
Figura 39	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos	

inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância. UA= unidade ativa.....110

Figura 40 Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância. UA= unidade ativa.....111

Figura 41 Atividade da enzima catalase (CAT) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância. UA= unidade ativa.....113

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Localização dos biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> coletados para realização do screening de resistência aos inibidores da HPPD. Rio Grande do Sul-RS, 2018.....	37
Tabela 2	Localização e percentual de controle de biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> em função da aplicação de tembotrione (100,8 g ha <sup>-1</sup> ) avaliados aos 30 dias após o tratamento (DAT). Capão do Leão, RS, 2019.....	42
Tabela 3	Dose necessária para promover 50% de controle (C50) ou reduzir em 50% a produção de massa seca (GR50) com intervalos de confiança (IC), e fator de resistência de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) em resposta à aplicação de diferentes herbicidas. Capão do Leão, RS, 2019/2020.....	55
Tabela 4	Controle (%) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) em função da aplicação de diferentes herbicidas pré-emergentes aos 30 dias após a emergência. Capão do Leão, RS, 2020.....	57
Tabela 5	Massa seca da parte aérea (MSPA) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) em função da aplicação de diferentes herbicidas pré-emergentes aos 30 dias após a emergência. Capão do Leão, RS, 2020.....	59
Tabela 6	Controle (%) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) aos 30 dias após a aplicação de diferentes herbicidas pós-emergentes. Capão do Leão, RS, 2020.....	60
Tabela 7	Massa seca da parte aérea (MSPA) de biótipos de leiteira ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ) aos 30 dias após a aplicação de diferentes herbicidas pós-emergentes. Capão do Leão, RS, 2020.....	61

Tabela 8	Nome do composto, fórmula molecular, massa molecular, tempo de retenção, íon precursor e produtos monitorados para tembotrione e seus metabólitos Capão do Leão, RS, 2020.....	67
Tabela 9	Oligonucleotídeos para o gene alvo e para os genes de referência utilizados para os estudos de expressão gênica em RT-qPCR. Capão do Leão, RS, 2020.....	71
Tabela 10	Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de leiteira suscetíveis (10.1) e resistentes (32.1) ao herbicida tembotrione. Capão do Leão, RS, 2022.....	118
Tabela 11	Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de leiteira suscetíveis (10.1) e resistentes (32.2) ao herbicida tembotrione. Capão do Leão, RS, 2022.....	119
Tabela 12	Controle aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) e Massa seca da parte aérea (MSPA) em função da aplicação de doses crescentes de tembotrione em biótipos de leiteira suscetível (S), Heterozigoto F1 (Het) e resistentes (R). Capão do Leão, RS, 2022.....	121

## Sumário

<b>1. Introdução geral.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Capítulo I – Mapeamento, identificação e controle alternativo de biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> resistentes a inibidores da HPPD .....</b>	<b>33</b>
2.1 Introdução.....	33
2.2 Material e Métodos .....	35
2.2.1 Mapeamento da resistência a inibidores da HPPD.....	35
2.2.2 Identificação da resistência múltipla e cruzada.....	38
2.2.3 Controle alternativo.....	40
2.3 Resultados e Discussão .....	41
2.3.1 Mapeamento da resistência a inibidores da HPPD.....	41
2.3.2 Identificação da resistência múltipla e cruzada.....	44
2.3.3 Controle alternativo.....	56
2.4 Conclusões .....	62
<b>3. Capítulo II – Investigação dos mecanismos de resistência associados a resistência de leiteira aos herbicidas inibidores da HPPD.....</b>	<b>63</b>
3.1 Introdução.....	63
3.2 Material e Métodos .....	65
3.2.1 Absorção, translocação e metabolismo de tembotrione .....	65
3.2.2 Efeito de inibidores da P450 no metabolismo de tembotrione.....	69
3.2.3 Expressão do gene HPPD.....	69
3.3 Resultados e Discussão .....	71
3.3.1 Absorção, translocação e metabolismo de tembotrione .....	71
3.3.2 Efeito de inibidores da P450 no metabolismo de tembotrione .....	82
3.3.3 Expressão do gene HPPD.....	85
3.4 Conclusões .....	86

<b>4. Capítulo III – Fluorescência da clorofila, fotossíntese e resposta antioxidante de <i>Euphorbia heterophylla</i> resistente aos inibidores da HPPD em função da aplicação de tembotrione .....</b>	<b>87</b>
4.1 Introdução .....	87
4.2 Material e Métodos .....	89
4.2.1 Fluorescência da clorofila .....	90
4.2.2 Fotossíntese .....	90
4.2.3 Clorofila, carotenoides, TBars, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e extravasamento de eletrólitos.....	91
4.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes.....	92
4.3 Resultados e Discussão .....	93
4.3.1 Fluorescência da clorofila .....	93
4.3.2 Fotossíntese .....	97
4.3.3 Clorofila, carotenoides, TBars, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e extravasamento de eletrólitos.....	104
4.3.4 Atividade de enzimas antioxidantes.....	109
4.4 Conclusões .....	113
<b>5. Capítulo IV – Herança da resistência de <i>Euphorbia heterophylla</i> aos inibidores da HPPD .....</b>	<b>114</b>
5.1 Introdução .....	114
5.2 Material e Métodos .....	116
5.3 Resultados e Discussão .....	117
5.4 Conclusões .....	122
<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>123</b>
<b>Referências .....</b>	<b>124</b>

## 1. Introdução geral

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de grãos, sendo cultivados anualmente cerca de 71,5 milhões de hectares, com produção de aproximadamente 268,2 milhões de toneladas (CONAB, 2022). A soja e o milho são as principais culturas produzidas no país, onde se estima a produção de 122,4 milhões de toneladas de soja, enquanto o milho deverá apresentar uma produção de 115,6 milhões de toneladas (CONAB, 2022). A Região Centro-Oeste possui a maior área semeada e maior produção nacional, seguido pela Região Sul onde são semeados 21,7 milhões de hectares e produzidos 65,8 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2022). Entre os Estados produtores, o Rio Grande do Sul (RS) apresenta a quarta maior produção, atrás do Mato Grosso, Paraná e Goiás, correspondendo por aproximadamente 8,3% da produção de soja e 2,6% de milho do país (CONAB, 2022).

A produtividade das culturas pode ser afetada por diversos fatores, tais como: condições ambientais desfavoráveis; sistemas de cultivo; práticas culturais; e manejo de pragas inadequados. Dentre as pragas, as plantas daninhas possuem destaque, visto que podem ser responsáveis por prejuízos superiores a 80% na cultura da soja (GAZZIERO; VARGAS; ROMAN, 2004). Os prejuízos decorrentes da interferência de plantas daninhas nas culturas agrícolas derivam, principalmente, da influência negativa no crescimento e desenvolvimento das culturas, devido à utilização de recursos limitados do nicho ecológico compartilhado entre a cultura e plantas daninhas, como água, luz e nutrientes (RADOSEVICH et al., 2007).

Dentre as plantas daninhas, se destaca *Euphorbia heterophylla* L. (leiteira, leiteiro ou amendoim-bravo), nativa da América do Sul e presente em 37 países, sendo de ocorrência comum em áreas agrícolas anuais dos continentes Americano, Africano e Asiático (WILSON, 1981). No Brasil, está presente nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, sendo encontrada nas principais áreas produtoras de grãos (milho e

soja) da região sul do país (VARGAS et al., 1999; VARGAS et al., 2013; MENDES et al., 2020a).

A leiteira é uma espécie anual, dicotiledônea, pertencente à família *Euphorbiaceae*, onde não se tem clareza quanto a classificação de seu metabolismo fotossintético, na qual pode variar entre C3 ou C4 (YUGUDA et al., 2016; YOUNG et al., 2022). Apresenta porte médio de 40 a 60 cm, com caule simples ou ramificado e nodificações em intervalos regulares, de coloração verde ou avermelhada. As folhas são alternadas, opostas ou verticiladas, medindo de 4-10 cm de comprimento, com ou sem bordas serrilhadas que ocorrem tanto no caule, quanto nos ramos, sendo que, na parte final dos ramos abaixo da inflorescência, ocorre maior concentração de folhas (CRONQUIST, 1981; KISSMANN; GROTH, 1999).

A flor da leiteira apresenta estrutura bissexual denominada de ciátio (CRONQUIST, 1981). Na inflorescência, localizada na parte terminal do caule e dos ramos, desenvolvem-se conjuntos de ciátios abertos na parte superior, que são involúcros obovoides com cerca de 2,5 mm de comprimento, formados por brácteas fusioladas. Cada ciátio abriga de 30 a 40 flores masculinas e apenas uma flor feminina, que é constituída pelo ovário, coroado por estiletos fendidos até a metade e apoiada sobre grosso pedicelo que, após a fecundação se alonga, posicionando o fruto de forma pendente ao lado do involúcro (VARGAS et al., 1999). A flor masculina é formada por um estame, articulado no pedicelo que circundam a flor feminina (KISSMANN; GROTH, 1999). O sistema de reprodução pode ser tanto por autofecundação como por fecundação cruzada, sendo predominante a autofecundação (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984; INGROUILLE, 1992).

A medida que amadurece, o fruto altera sua coloração e quando atinge maturação plena apresenta deiscência explosiva (bolocoria) como mecanismo de dispersão de sementes a curtas distâncias (NARBONA et al., 2005). Essas características proporcionaram grande diversidade genética entre biótipos de leiteira oriundos de diferentes locais (WINKLER et al., 2003), havendo alta variabilidade genética entre populações dessa espécie.

As sementes podem ter formas globosas, ovóides, cônicas, mais ou menos angulares, com 2-3 mm de comprimento por 2,5 mm de largura. Apresentam dois cotilédones e testa rígida, com a superfície áspera e sem pelos, de coloração escura e/ou marmorada (CRONQUIST, 1981; KISSMANN; GROTH, 1999). O número de sementes produzidas por planta é variável, sendo fortemente correlacionado com

número de ramificações, no entanto, de maneira geral cada planta produz em torno de 500 sementes, que apresentam baixo nível de dormência, que pode ser superada através de escarificação mecânica (SANTOS et al., 2002).

As sementes germinam em temperaturas variando de 20 a 40°C, apresentando germinação ótima a 35°C, por outro lado, a luz pouco influencia na germinação das sementes (BRECKE et al, 1995). A maior emergência (80%) das sementes ocorre quando semeadas entre 2 e 4 cm abaixo da superfície do solo, no entanto, parte das sementes (20%) podem emergir quando semeadas a 14 cm de profundidade (BRECKE et al, 1995). Sementes de leiteira enterradas superficialmente apresentaram germinação completa em até nove meses de enterrio, enquanto aquelas em profundidades maiores de 15 cm apresentaram baixos índices germinação (BANNON et al., 1978). Essa sensibilidade à luz, depois da semente enterrada no solo pode estar envolvida com ciclos de dormência controlada por fitocromos (BANNON et al., 1978). A leiteira se desenvolve em uma ampla gama de condições, crescendo em quase todos os tipos de solos, mas preferindo solos férteis e bem drenados, podendo apresentar duas ou até três gerações anuais (VIDAL et al., 2007).

A ocorrência da resistência de leiteira a herbicidas dificulta o manejo desta planta daninha. A resistência é definida pela capacidade natural e herdável de um biótipo de planta daninha, sobreviver e reproduzir-se após a aplicação de herbicida (dose máxima de registro), que sob condições normais, controlam os demais integrantes da população (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003; GAZZIERO et al., 2009). No Brasil são relatados casos de resistência de leiteira aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL; MEROTTO JÚNIOR, 1999), da protopofirinogênio oxidase (PROTOX) (TREZZI et al., 2005) e ao glyphosate, herbicida inibidor da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (MENDES et al., 2020a). Além destes casos, na América Latina, o Equador apresenta registro de biótipos de leiteira resistentes a linuron, herbicida inibidor do fotossistema II (HEAP, 2022).

A resistência de leiteira aos inibidores da ALS e PROTOX na década de 90 e início dos anos 2000 no Brasil, decorreu do uso intensivo e continuado destes herbicidas, por serem uma das limitadas opções de manejo químico em pós-emergência de soja convencional (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL; MEROTTO JÚNIOR, 1999; TREZZI et al., 2005). A introdução da soja transgênica resistente ao

herbicida glyphosate favoreceu o controle de leiteira resistente aos inibidores de ALS e PROTOX (TREZZI et al., 2006). No entanto, com o uso continuado da tecnologia RR<sup>®</sup>, aliada a tolerância da espécie ao herbicida glyphosate, favoreceu a permanência da planta daninha nas áreas agrícolas após a aplicação do herbicida. Sendo que, em 2011/12, vários produtores de soja do RS relataram dificuldade de controle de leiteira pela aplicação de glyphosate, sendo documentada a resistência de baixo nível em 2016 (ULGUIM et al., 2017) e posteriormente em 2019 biótipos no Paraná foram identificados com dupla mutação na EPSPS (Tre102Ile + Pro106Tre) , com fator de resistência elevados variando de 6,1 a 6,9 vezes (MENDES et al., 2020a).

Por outro lado, na cultura do milho, a resistência de plantas daninhas a herbicidas pode ter impulsionado o emprego de herbicidas inibidores da hidroxifenil piruvato dioxigenase (HPPD), uma vez que o emprego destes herbicidas vem aumentando nos últimos anos no Brasil (FARIA et al., 2019). Os herbicidas inibidores da HPPD na cultura do milho apresentam amplo espectro de controle de plantas daninhas mono e eudicotiledôneas, flexibilidade no tempo de aplicação, possibilidade de uso em misturas com compostos pertencentes aos principais mecanismos de ação herbicidas e capacidade de sinergismo com herbicidas inibidores do fotossistema II (ABENDROTH et al., 2006).

A hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD, EC 1.13.11.27) é uma enzima onipresente, não heme-oxigenase envolvida no catabolismo do aminoácido tirosina (HAMPRECHT et al., 2012). Além disso, é uma enzima chave na síntese de homogentisato, precursor da plastoquinona, tocoferol e carotenoides em plantas (MORAN, 2005). Mais especificamente, HPPD catalisa a conversão de 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) em homogentisato em uma reação complexa que envolve descarboxilação da cadeia lateral de 2-ceto ácido de HPP, seguida pela hidroxilação do anel aromático e o rearranjo do grupo 1,2 carboximetil, onde a reação consome uma molécula de oxigênio, liberando dióxido de carbono (JEFFORD; CADBY, 1981; FRITZE et al., 2004).

O tocoferol elimina as espécies reativas de oxigênio derivadas da fotossíntese, prevenindo a peroxidação lipídica (MAEDA; DELLAPENNA, 2007). A utilização de mutantes deficientes demonstrou que o tocoferol também desempenha papel em outros processos fisiológicos importantes, como germinação, crescimento e senescência foliar (FALK; MUNNÉ-BOSCH, 2010). A plastoquinona apresenta duas importantes funções no metabolismo vegetal, atuando como acceptor de elétrons para

a enzima fitoeno desaturase (PDS), envolvida na biossíntese de carotenoides, bem como, a alternância entre a reduzida e oxidada no transporte de elétrons do fotossistema II, mais especificamente entre a proteína D1 e o complexo citocromo B<sub>6</sub>F (RUIZ-SOLA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2012).

A inibição da enzima HPPD, e conseqüentemente a inibição da síntese de plastoquinona, acarreta na interrupção da síntese de carotenoides que atuam protegendo o cloroplasto através da dissipação do excesso de energia das clorofilas, evitando a formação de clorofila tripleto, oxigênio singlete, e conseqüentemente a peroxidação lipídica (LEE et al., 1998). Por outro lado, a falta de plastoquinona reduz o fluxo de elétrons, sobrecarregando o FSII e formando espécies reativas de oxigênio (TREBST et al., 2004).

O sistema antioxidante enzimático, no qual inclui as enzimas superóxido redutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), atuam para manter a homeostase celular. A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ) (CARVEZAN et al., 2019); a partir de então, várias outras enzimas antioxidantes, atuam sobre o  $H_2O_2$ . As CATs catalisam a redução direta do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ , enquanto as APXs eliminam o  $H_2O_2$  com o uso de ascorbato (CARVEZAN et al., 2019). A perda de tocoferóis, carotenoides, clorofilas e plastoquinona, devido a inibição da HPPD em plantas suscetíveis resulta na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, acima da capacidade de dissipação das células vegetais, desencadeando o estresse oxidativo, que resulta na peroxidação lipídica, rompimento das membranas celulares e, por fim, à morte de plantas suscetíveis (VAN ALMSICK, 2009).

Os inibidores da HPPD representam uma das mais recentes classes de herbicidas para o controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas em cereais (MATRINGE et al., 2005). Eles pertencem a uma série de compostos estruturalmente diversos que os permitem ser agrupados em isoxazóis, pirazolonas e tricetonas (AHRENS et al., 2013). Pirazolinato foi o primeiro herbicida inibidor da HPPD a ser comercializado no final dos anos 70 para manejo de plantas daninhas anuais e perenes em arroz, embora seu modo de ação não estivesse esclarecido até o momento do lançamento (HAMPRECHT, et al., 2012).

O mecanismo de ação dos herbicidas inibidores da HPPD somente foi elucidado no início dos anos 90, quando se verificou que a tricetona nitisinona era um potente inibidor da enzima HPPD isolada de camundongos e mamíferos (LINDSTEDT

et al., 1992). Estudos genéticos e bioquímicos subsequentes, demonstraram que os compostos estruturalmente relacionados tricetona, isoxazol e pirazolona eram inibidores competitivos da enzima HPPD em plantas (MITCHELL et al., 2001; GROSSMANN; EHRHARDT, 2007). O modo preciso de ação dos inibidores de HPPD foi confirmado através de estudos de co-cristalografia revelando papéis centrais desempenhados por dois resíduos de fenilalanina na ligação de compostos benzoilpirazole à enzima alvo (FRITZE et al., 2004; YANG et al., 2004).

Atualmente, os quatro principais herbicidas inibidores da HPPD são mesotrione, isoxaflutole, tembotrione e topramezone, os quais mundialmente representam mais de 80% do mercado de herbicidas inibidores da HPPD (KAUNDUN et al., 2017). Somente mesotrione, tembotrione e isoxaflutole são comercializados no Brasil, sendo empregados no manejo de plantas daninhas mono e eudicotiledôneas, especialmente na cultura do milho e da cana-de-açúcar. O rápido metabolismo via hidroxilação mediada por citocromo P450 monooxigenases, combinada com a reduzida absorção, tem sido atribuída como a base da seletividade de mesotrione em milho (MITCHELL et al., 2001). Por outro lado, topramezone e sulcotrione demonstraram baixa afinidade com a enzima HPPD isolada de plântulas de milho, requerendo cerca de 10 vezes mais herbicida que as enzimas de plantas sensíveis de *Setaria faberi*, para inibição de 50% da atividade enzimática (GROSSMANN; EHRHARDT, 2007).

A demanda por herbicidas HPPD tem projeção de incremento nos próximos anos, sendo este fato resultante do desenvolvimento de soja transgênica resistente a HPPD, como alternativa para manejar a crescente evolução da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate (OLIVEIRA et al., 2017a). No entanto, similarmente como acontecem com outros herbicidas que são empregados consecutivamente ao longo de vários anos, os inibidores da HPPD exercem pressão de seleção sobre plantas daninhas. Estudos visando controle químico de biótipos de leiteira oriundos de diferentes localidades do RS, evidenciaram controle diferenciado pela aplicação de tembotrione, e os ensaios de curva dose-resposta sugeriram a existência de biótipos resistentes (SILVA et al., 2016), porém os mecanismos de resistência envolvidos permanecem a ser elucidados.

Três casos mundiais de resistência aos herbicidas inibidores da HPPD são conhecidos, os quais envolvem *Amaranthus palmeri*, *A. tuberculatus* e *Raphanus raphanistrum* (HEAP, 2022). Dentre os mecanismos de resistência elucidados, são

relatados casos de metabolização isolados, ou associados com a super-expressão da enzima alvo (LU et al., 2020; KÜPPER et al., 2017; KAUNDUN et al., 2017; NAKKA et al., 2017).

Em *A. palmeri* o metabolismo de  $^{14}\text{C}$  tembotrione em plantas resistentes foi mais rápido que em suscetíveis, onde o biótipo resistente apresentou rápida formação de 4-hidroxi-tembotrione seguida de glicosilação, sendo verificado um total de nove metabólitos formados a partir da molécula herbicida, sugerindo que a resistência se deve principalmente pela oxidação mediada via citocromo P450 (KÜPPER et al., 2017). Por outro lado, além da metabolização de mesotrione em formas atóxicas, plantas resistentes de *A. palmeri* apresentaram de 4 a 12 vezes maior expressão do gene HPPD, conferindo maior expressão da enzima HPPD do que em plantas suscetíveis (NAKKA et al., 2017).

Altos níveis de metabolismo de mesotrione também foram observados via 4-hidroxilação do anel diona em plantas resistentes de *A. tuberculatus* (MA et al., 2013; KAUNDUN et al., 2017). As plantas resistentes apresentaram baixos níveis de mesotrione translocado a partir da folha tratada, para outras partes da planta, como consequência do metabolismo nas folhas tratadas (KAUNDUN et al., 2017). Em biótipos de *R. raphanistrum* o tempo necessário para as plantas resistentes metabolizarem 50% [14C]-mesotrione foi 7,7 vezes mais rápido do que em plantas suscetíveis (LU et al., 2020).

A aplicação em pós-emergência dos inibidores da P450 monooxigenase (malation, amitrole e PBO) com herbicidas inibidores de HPPD (mesotrione, tembotrione e topamezone) mostrou um potencial para reverter a resistência de *A. tuberculatus* para um fenótipo suscetível (OLIVEIRA et al., 2017a). Do mesmo modo, malation e tetciclacis reduziram significativamente o metabolismo de mesotrione em milho e *A. tuberculatus* resistente a HPPD, mas não para a população suscetível (MA et al., 2013). Além disso, o malation aumentou o controle com mesotrione em plântulas resistentes em estudos realizados em casa-de-vegetação (OLIVEIRA et al., 2017a). Assim, esses resultados indicam que o aumento do metabolismo oxidativo da molécula de mesotrione, contribui significativamente para a ocorrência de resistência ao herbicida, e a mistura do herbicida com inibidores da P450 monooxigenase, pode restaurar a suscetibilidade dos biótipos resistentes (MA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017a).

O malation (inseticida organofosforado) atua como um “substrato suicida” para as enzimas citocromo P450, devido à liberação de espécies reativas de enxofre durante seu metabolismo, nas quais podem se ligar covalentemente em determinadas enzimas P450 (CORREIA; MONTELLANO, 2005). Como resultado, potenciais herbicidas substratos de enzimas P450 deixam de ser metabolizados, permitindo a inibição da enzima alvo e conseqüentemente a ação herbicida.

Butóxido de piperonila (PBO) também é um conhecido inibidor de enzimas P450, onde sua ação inibitória decorre da ligação ao sítio ativo das P450 seguido do metabolismo a um complexo inibidor pseudoirreversível entre um radical carbeno do grupo metilendioxifenil do PBO e o grupo heme das P450 (FEYEREISEN, 2015). Como a inibição é dependente do metabolismo, a eficiência da inibição é dependente da enzima P450 em particular, de modo que o PBO não seja um inibidor "universal" para todas as enzimas P450. Diversos trabalhos relatam a reversão da resistência metabólica governada por enzimas P450, em herbicidas inibidores do FSII, ALS, Protox e HPPD através da associação com PBO (VARSANO et al., 1992; TORRA et al., 2021; VARANASI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

Outro fator que interfere na evolução das plantas daninhas para a resistência, é a diversidade genética existente em uma população, resultado do processo de evolução natural da espécie que a compõe, em função da variação mendeliana, hibridação interespecífica e poliploidia (WINKLER et al., 2003). Estudo de caracterização genética de doze populações de leiteira dos Estados do Paraná (PR) e Mato Grosso evidenciaram que as populações são geneticamente estruturadas, apresentando alto índice de homozigose, atribuídas à seleção herbicida (FRIGO et al., 2009). Para 40 populações resistentes aos inibidores da ALS do RS, a similaridade genética foi de 40%, índice considerado baixo indicando não haver fluxo gênico entre estas populações (WINKLER et al., 2003). Entre populações do mesmo município verificou-se alto índice de similaridade (WINKLER et al., 2003), confirmando a dispersão limitada da espécie. O baixo índice de dispersão a longas distâncias de leiteira favorece a ocorrência de altas infestações nas lavouras com reduzida eficiência de controle (FRIGO et al., 2009).

Estudos de herança podem melhorar o conhecimento sobre a estrutura de populações de plantas daninhas sob seleção de herbicidas, e auxiliam na criação de modelos apropriados de simulação da evolução de resistência a herbicidas (RENTON et al., 2014). Em estudo de herança da resistência para o inibidor da HPPD mesotrione

em *A. tuberculatus*, foi verificado que a resistência é herdada nuclearmente e provavelmente mediada por múltiplos genes, uma vez que, em plantas onde o mecanismo de resistência é a metabolização, múltiplas proteínas desempenham papel importante na conjugação, compartimentalização, degradação e compensação do herbicida (OLIVEIRA et al., 2018). Já para leiteira, a resistência aos inibidores da ALS é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa (VARGAS et al., 2001), proporcionando a evolução da resistência mais rapidamente, em espécies de fecundação cruzada, sendo limitada no caso da leiteira devido a elevada taxa de autofecundação (MITHILA; GODAR, 2013; VARGAS et al., 2001).

Desse modo, o conhecimento das características que envolvem a identificação das características genéticas, bioquímicas e metabólicas da espécie, associada a caracterização da herança da resistência aos herbicidas inibidores da HPPD, podem auxiliar no entendimento da ocorrência das falhas de controle. Além disso, a compreensão das estratégias adotadas pelas plantas resistentes para sobreviver ao estresse oxidativo causado pelo herbicida, através da verificação de respostas bioquímicas e fisiológicas, é importante para elucidar a estratégia evolutiva das plantas para resistência, e assim propor estratégias para o manejo destas populações.

Assim, esse trabalho teve as seguintes hipóteses: existem biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da HPPD no Estado do Rio Grande do Sul, apresentando como mecanismo de resistência a metabolização do herbicida; existem alterações na atividade fotossintética, conteúdo de metabólitos secundários e na atividade do sistema antioxidante entre os biótipos suscetível e resistentes sob a exposição de tembotrione; e a herança da resistência é poligênica de dominância incompleta. Os objetivos foram identificar, caracterizar e mapear a resistência de leiteira aos inibidores da HPPD no Rio Grande do Sul; determinar o mecanismo de resistência; analisar a resposta fisiológica, metabólica e antioxidante de biótipos resistentes e suscetível aos inibidores da HPPD sob exposição ao herbicida tembotrione; e, determinar modo e tipo de herança da resistência aos inibidores da HPPD em leiteira.

## **2. Capítulo I – Mapeamento, identificação e controle alternativo de *Euphorbia heterophylla* resistente a inibidores da HPPD no Rio Grande do Sul**

### **2.1 Introdução**

Os herbicidas são a principal ferramenta de controle de plantas daninhas nos mais diversos sistemas de cultivo agrícola no mundo. Mesmo com a massiva utilização, o controle completo ou a erradicação de plantas daninhas raramente é alcançado. Isso ocorre porque as plantas daninhas persistem nos agroecossistemas, desenvolvem características para sobreviver às estratégias de manejo adotadas, incluindo a evolução biológica, onde biótipos de uma determinada população tornam-se resistentes a herbicidas (HAUSMAN et al., 2011). A resistência é caracterizada como a capacidade adquirida e herdável de um biótipo, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após exposição à dose de registro de determinado herbicida, que normalmente é letal à população original (VENCILL et al., 2012).

Atualmente, existem 512 casos de resistência, envolvendo 266 espécies de plantas daninhas distribuídas mundialmente (HEAP, 2022). As plantas daninhas desenvolveram resistência a 21 dos 31 mecanismos de ação herbicida, incluindo 165 diferentes ingredientes ativos (HEAP, 2022). No Brasil, são 53 casos de resistência envolvendo 28 diferentes espécies de plantas daninhas (HEAP, 2022). Dentre elas, a leiteira (*Euphorbia heterophylla*) apresenta resistência aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL; MEROTTO JÚNIOR, 1999), da protopofirinogênio oxidase (PROTOX) (TREZZI et al., 2005) e da 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (MENDES et al., 2020a). Além dos casos registrados, foi verificado controle diferenciado de biótipos de leiteira oriundos de diferentes localidades do RS após aplicação de tembotrione, herbicida inibidor da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD). Ensaio de curva dose-resposta realizados nos biótipos sugeriram a existência de biótipos resistentes (SILVA et al., 2016), porém

a distribuição destes biótipos, a resposta aos diferentes grupos químicos de inibidores da HPPD e o controle por herbicidas de diferentes mecanismos de ação, não foram elucidados.

Os herbicidas que inibem a HPPD constituem uma das novas classes de herbicidas disponíveis comercialmente para uso em milho, cana-de-açúcar e cereais. A busca e descoberta de compostos que inibem a HPPD vem crescendo ano a ano (LEI et al., 2016; FU et al., 2021), sendo que uma série de novos herbicidas podem ser lançados comercialmente em um futuro próximo (SHAH, 2021). Além disso, o incremento dos casos de plantas daninhas resistentes poderá alavancar ainda mais o uso destes produtos, uma vez que, já existem cultivares de soja geneticamente modificada nos Estados Unidos, que permitem a aplicação destes herbicidas em pré e pós emergência (SCHRYVER et al., 2017).

A HPPD catalisa a conversão de 4-hidroximetilpiruvato em homogentisato, que está envolvido na biossíntese de plastoquinona e tocoferóis (GROSSMANN; EHRHARDT, 2007). A inibição de HPPD por herbicidas leva à destruição fotooxidativa da clorofila e das membranas fotossintéticas nos meristemas, resultando em um branqueamento característico do novo tecido foliar, enquanto a depleção da plastoquinona, leva a excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e extravasamento celular de tecidos fotossintéticos já estabelecidos (GROSSMANN; EHRHARDT, 2007).

A confirmação e quantificação da resistência são realizados por estudos de curva dose-resposta, que permitem a determinação da dose necessária para promover o controle de 50% da população ( $DL_{50}$ ) e dose necessária para reduzir em 50% a produção de massa seca da população ( $GR_{50}$ ) (BURGOS et al., 2013; GAZZIERO et al., 2014). Conhecendo-se estas variáveis, calcula-se o fator de resistência (FR), que representa quantas vezes a dose precisou ser aumentada no biótipo resistente, para que este demonstrasse o mesmo percentual de controle, ou redução da massa seca da parte aérea que o biótipo suscetível (HALL et al., 1998).

Para espécies resistentes aos inibidores da HPPD o FR foi variável, sendo observados valores de 2,9 a mais de 12. Em *Amaranthus palmeri* o FR foi de 3,3 quando aplicado tembotrione (KÜPPER et al., 2017). Em *Amaranthus tuberculatus* foram constatados FR de 13, 6 e 3 para mesotrione, tembotrione e topramezone, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2017b). Para *Raphanus raphanistrum* foram

observados FR de 6,5; 5,5 e 4, para tembotrione, mesotrione e isoxaflutole, respectivamente (LU et al., 2020).

Diante disso, são necessários estudos para avaliar a ocorrência de populações de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da HPPD, permitindo identificar os locais de ocorrência da resistência, os grupos químicos de inibidores da HPPD afetados, além de identificar o nível da resistência e os herbicidas remanescentes para o manejo da espécie. O domínio dessas informações, associado ao conhecimento das características biológicas da espécie, será importante para a definição futura de estratégias de prevenção, manejo e controle da resistência da planta daninha aos herbicidas.

Os objetivos do trabalho foram identificar e mapear a ocorrência da resistência de leiteira aos herbicidas inibidores da HPPD no Estado do RS, determinar a  $DL_{50}$  e  $GR_{50}$  de biótipos resistentes, verificar a ocorrência de resistência múltipla e cruzada e determinar quais herbicidas permanecem eficientes para o controle em pré e pós emergência da espécie.

## **2.2 Material e Métodos**

Para a realização dos estudos, foram coletadas amostras de sementes de leiteira em lavouras comerciais de soja e milho em diferentes municípios do Estado do Rio Grande do Sul (RS). A coleta foi realizada durante os meses de fevereiro e março de 2018, em propriedades localizadas nos municípios da metade norte do RS, que corresponde a principal região produtora de soja e milho do Estado, e, onde a leiteira permanece como uma das principais plantas daninhas dessas culturas.

Foram coletadas 54 amostras, cada amostra correspondente a uma planta de uma lavoura, abrangendo 43 municípios do RS (Figura 1; Tabela 1). Cada ponto de coleta foi georreferenciado e as sementes acondicionadas separadamente em sacos de papel. As sementes coletadas foram utilizadas nos estudos descritos a seguir.

### **2.2.1 Mapeamento da resistência a inibidores da HPPD**

Para comprovar a resistência foi realizado em janeiro de 2019 um *screening* em casa de vegetação, pertencente ao Centro de Estudos em Herbologia (CEHERB/UFPEL), em delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições. Os biótipos de leiteira foram semeados em bandejas de isopor, preenchidas com substrato Biomix<sup>®</sup>. No estágio cotiledonar as plântulas foram

transplantadas em caixas de 2,5 m x 30 cm x 18 cm (comprimento x largura x altura) em linhas espaçadas a 20 cm, sobre uma mistura de solo e substrato na proporção de 3:1.

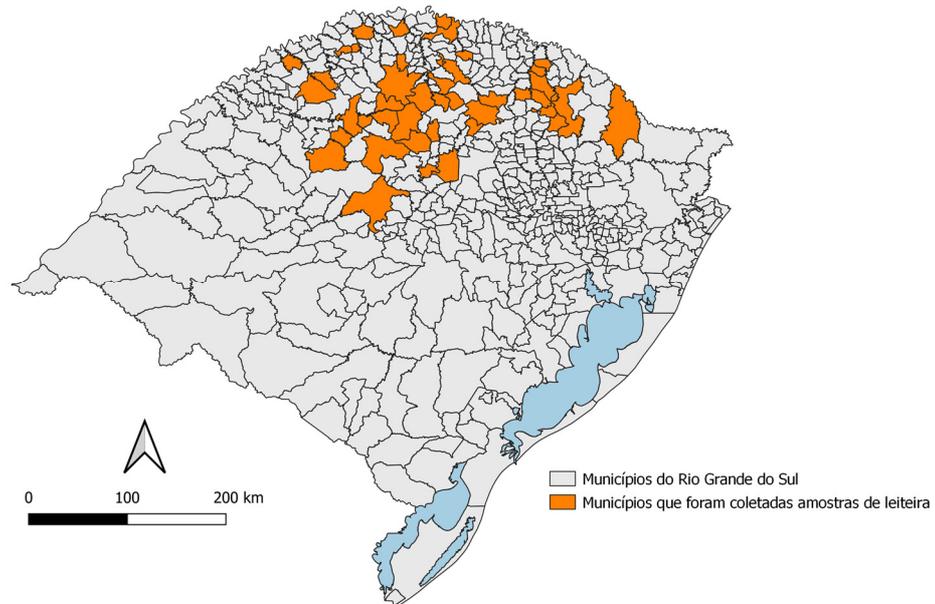


Figura 1- Localização geográfica dos municípios onde foram coletados biótipos de *Euphorbia heterophylla* na safra 2017/18. Rio Grande do Sul-RS, 2018.

No estágio de desenvolvimento de duas a quatro folhas, foi realizada a aplicação do herbicida tembotrione, na dose de 100,8 g ha<sup>-1</sup> acrescido de óleo metilado de soja na proporção de 0,5% v/v. Esta dose corresponde a maior dose registrada para o controle de leiteira na cultura do milho (AGROFIT, 2021). Para aplicação do herbicida, foi utilizado pulverizador costal, pressurizado com CO<sub>2</sub>, equipado com pontas de ar induzido, tipo leque (110.015), regulado para aspergir volume de calda equivalente a 150 L ha<sup>-1</sup>. A variável controle, foi avaliada visualmente, aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), utilizando-se escala de 0 a 100%, onde zero significa a ausência de injúrias, e 100 a morte da planta (SBCPD, 1995).

Tabela 1- Localização dos biótipos de *Euphorbia heterophylla* coletados para realização do screening de resistência aos inibidores da HPPD. Rio Grande do Sul-RS, 2018.

Biótipo	Cidade	Coordenadas Geográficas	
		Latitude	Longitude
1.1	Almirante Tamandaré do Sul	28°06'15"	52°58'44"
2.1	Augusto Pestana	28°31'23"	54°01'07"
3.1	Boa Vista das Missões	27°38'01"	53°20'07"
4.1	Bom Progresso	27°34'42"	53°52'01"
5.1	Bozano	28°21'41"	53°45'18"
6.1	Campos Borges	28°51'19"	52°59'00"
7.1	Caseiros	28°17'18"	51°39'12"
8.1	Chapada	28°06'57"	53°00'53"
9.1	Colorado	28°30'21"	52°58'54"
10.1	Condor (21.1)	28°14'00"	53°36'58"
11.1	Coqueiros do Sul	28°12'59"	52°45'54"
12.1	Coxilha	28°08'46"	52°14'31"
13.1	Cruz Alta	28°46'30"	53°35'08"
14.1	Cruzaltense	27°38'16"	52°41'00"
15.1	Engenho Velho	27°42'45"	52°54'55"
16.1	Ernestina	28°28'37"	52°33'24"
16.2	Ernestina	28°22'60"	52°31'31"
17.1	Espumoso	28°44'59"	52°52'58"
18.1	Frederico Westphalen	27°25'09"	53°25'49"
19.1	Giruá	27°57'36"	54°25'16"
19.2	Giruá	28°04'02"	54°24'45"
20.1	Humaitá	27°33'42"	53°59'59"
21.1	Ibiaça	28°08'59"	51°41'36"
22.1	Ibiraiaras	28°18'22"	51°38'16"
22.2	Ibiraiaras	28°18'22"	51°38'16"
23.1	Ibirubá	28°38'08"	53°12'57"
24.1	Ijuí	28°26'16"	53°56'30"
24.2	Ijuí	28°23'39"	53°58'13"
24.3	Ijuí	28°29'11"	53°50'20"
25.1	Independência	27°49'20"	54°12'06"
26.1	Jóia	28°42'18"	54°18'27"
27.1	Julio de Castilhos	29°09'10"	53°39'23"
27.2	Júlio de Castilhos	29°17'60"	53°40'09"
28.1	Lagoa Vermelha	28°12'37"	51°36'31"
29.1	Nonoai	27°18'13"	52°45'03"
29.2	Nonoai	27°27'50"	52°48'33"
30.1	Paim Filho	27°41'35"	51°46'58"
31.1	Palmeira das Missões	27°53'26"	53°16'25"
32.1	Panambi (11.1)	28°17'46"	53°25'59"
32.2	Panambi (11.4)	28°26'02"	53°29'60"
32.3	Panambi	28°19'59"	53°39'59"
33.1	Passo Fundo	28°10'46"	52°30'43"
34.1	Rio dos Índios	27°17'32"	52°51'19"
35.1	Ronda Alta	27°51'36"	52°46'21"
35.2	Ronda Alta	27°50'16"	52°46'41"

.....continua na próxima página

Biótipo	Cidade	Coordenadas Geográficas	
		Latitude	Longitude
36.1	Sananduva	27°54'03"	51°49'14"
37.1	Santa Bárbara do Sul	28°22'60"	53°21'54"
38.1	São João da Urtiga	27°47'06"	51°49'18"
39.1	Sarandi	27°54'12"	52°51'09"
39.2	Sarandi	28°02'48"	52°56'18"
40.1	Tapejara	28°04'10"	51°54'53"
41.1	Tenente Portela	27°22'24"	53°46'51"
42.1	Tuparendi	27°45'59"	54°29'10"
43.1	Vacaria	28°01'46"	51°00'59"

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Ocorrendo significância estatística, os biótipos foram comparados pelo teste de Scottknott ( $p \leq 0,05$ ). Para fins de mapear os biótipos, aqueles que apresentaram controle entre 80-100%, foram considerados suscetíveis e o município correspondente foi preenchido com a cor verde, de 58-79% classificados como moderadamente suscetíveis e representados pela cor amarela, os inferiores a 58%, foram considerados como possíveis resistentes ao herbicida tembotrione e discriminados pela cor vermelha. Os mapas foram construídos na plataforma QGIS 3.18, utilizando *shapefiles* do Estado do Rio Grande do Sul disponibilizados pela Fepam.

### 2.2.2 Identificação da resistência múltipla e cruzada

Para a confirmação da resistência de leiteira aos inibidores da HPPD foram realizados experimentos para determinação da dose do herbicida necessária para controle de 50% da população ( $C_{50}$ ) e redução de 50% do acúmulo de matéria seca das plantas ( $GR_{50}$ ). Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, utilizando-se delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições. As unidades experimentais consistiram de vasos plásticos de 700 ml contendo mistura de solo e substrato na proporção de 3:1, onde foi transplantado uma planta de leiteira por vaso.

Para confirmação da resistência aos inibidores da HPPD foram selecionados 2 biótipos considerados possivelmente resistentes (32.1 e 32.2) e um suscetível (10.1) do screening realizado no experimento anterior, sendo que além do percentual de controle, o critério também incluiu que os biótipos pertencessem a mesma região geográfica. Nestes biótipos foram aplicadas doses crescentes de diferentes herbicidas

inibidores da HPPD, sendo eles: tembotrione (0; 25,2; 50,4; 100,8; 201,6; 403,2; 806,4; 1612,8 e 3225,6 g ha<sup>-1</sup>) acrescido de óleo metilado de soja na proporção de 0,5% v/v; mesotrione (0, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536 e 3072 g ha<sup>-1</sup>) com a adição de óleo mineral na proporção de 0,5% v/v; e isoxaflutole (0; 14,06; 28,12; 56,25; 112,5; 225; 450 e 900 g ha<sup>-1</sup>). Para verificação da ocorrência de resistência múltipla, foram aplicadas doses crescentes do inibidor da protoporfirinogênio oxidase (Protox) fomesafem (0; 31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 e 8000 g ha<sup>-1</sup>) acrescido de espalhante adesivo aniônico, na concentração de 0,2% v/v; e do inibidor da acetolactato sintase (ALS) imazetapir (0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 e 3200 g e.a. ha<sup>-1</sup>). Os tratamentos foram aplicados em pós-emergência, quando as plantas atingiram o estágio de três a quatro folhas, sendo a pulverização efetuada nas mesmas condições descritas no experimento de mapeamento da resistência.

As variáveis analisadas foram controle e massa seca da parte aérea (MSPA). O controle foi avaliado visualmente aos 30 DAT, utilizando-se escala percentual de 0 a 100%. Aos 30 DAT também foi realizada coleta das plantas para determinação da MSPA. Para isso, a parte aérea das plantas foi seccionada na superfície do solo, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60°C, por ±72 horas quando foi aferida a massa do material em balança analítica de precisão.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade (teste de Shapiro-Wilk e Hartley, respectivamente) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). No caso de significância estatística, foi realizada análise de regressão, ajustando-se os dados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico:

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

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

A partir dos valores de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  foram obtidos os fatores de resistência para cada combinação dos biótipos resistentes com o suscetível. Para a utilização desse fator foi calculado o intervalo de confiança ( $p \geq 0,95$ ) do biótipo suscetível em relação aos resistentes. A sobreposição do intervalo de confiança indica que não ocorre diferença significativa entre a  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  entre os biótipos (AVILA et al., 2005).

### 2.2.3 Controle alternativo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao CEHERB/UFPel, utilizando delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. No experimento de herbicidas pré-emergentes, as unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos, com capacidade de 2L, preenchidos com Argissolo Vermelho-Amarelo de textura franco-arenosa, pertencente à unidade de mapeamento de Pelotas-RS (EMBRAPA, 2013). Foram semeadas 50 sementes por biótipo com no mínimo 80% de viabilidade em cada vaso, sendo os herbicidas aplicados em solo úmido (próximo a capacidade de campo), logo após a semeadura dos biótipos. Os herbicidas testados foram: atrazina ( $2500 \text{ g ha}^{-1}$ ), clomazone ( $1260 \text{ g ha}^{-1}$ ), diclosulam ( $35 \text{ g ha}^{-1}$ ), flumetsulam ( $140 \text{ g ha}^{-1}$ ), flumioxazina ( $20 \text{ g ha}^{-1}$ ), fomesafem ( $500 \text{ g ha}^{-1}$ ), isoxaflutole ( $262 \text{ g ha}^{-1}$ ) e sulfentrazone ( $400 \text{ g ha}^{-1}$ ).

Os herbicidas empregados em pós emergência foram aplicados em plantas de leiteira no estágio de quatro folhas, cultivadas conforme descrito no estudo de identificação da resistência múltipla e cruzada. Os herbicidas testados foram: cloransulam metílico ( $30 \text{ g ha}^{-1}$ ), clorimurom etílico ( $20 \text{ g ha}^{-1}$ ), metsulfurom metílico ( $4 \text{ g ha}^{-1}$ ), nicosulfurom ( $60 \text{ g ha}^{-1}$ ), atrazina ( $2500 \text{ g ha}^{-1}$ ), bentazona ( $960 \text{ g ha}^{-1}$ ), paraquat ( $400 \text{ g ha}^{-1}$ ), paraquat + diuron ( $400+200 \text{ g ha}^{-1}$ ), saflufenacil ( $49 \text{ g ha}^{-1}$ ), glifosato ( $1400 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ ), amônio glufosinato ( $400 \text{ g ha}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $1005 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ ).

Para aplicação dos herbicidas pré e pós emergentes, foi utilizado pulverizador costal, pressurizado com  $\text{CO}_2$ , equipado com pontas de ar induzido, tipo leque (110.015), regulado para aspergir volume de calda equivalente a  $150 \text{ L ha}^{-1}$ . As variáveis analisadas foram controle e MSPA, sendo as avaliações realizadas aos 30 dias após a emergência (DAE), para os herbicidas pré emergentes e 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) para os herbicidas pós emergentes. A metodologia de avaliação de controle e MSPA, foram equivalentes a adotada no estudo de identificação da resistência múltipla e cruzada.

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

## 2.3 Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados segundo a ordem descrita no material e métodos.

### 2.3.1 Mapeamento da resistência a inibidores da HPPD

A aplicação de tembotrione na dose de  $100,8 \text{ g ha}^{-1}$  evidenciou diferentes respostas de controle nos biótipos de leiteira coletados (Figura 2; Tabela 2). Das 54 amostras coletadas, 9,2% apresentaram injúrias inferiores à 58%, sendo consideradas como possíveis resistentes aos inibidores da HPPD. Uma percentagem considerável dos biótipos testados (35,2%) apresentou controle intermediário entre 58-79%, ou seja, aquém dos 80% de eficácia agrônômica preconizado para o registro de produtos fitossanitários. 55,6% dos biótipos testados apresentaram controle satisfatório, acima de 80%, sendo considerados suscetíveis ao herbicida tembotrione.

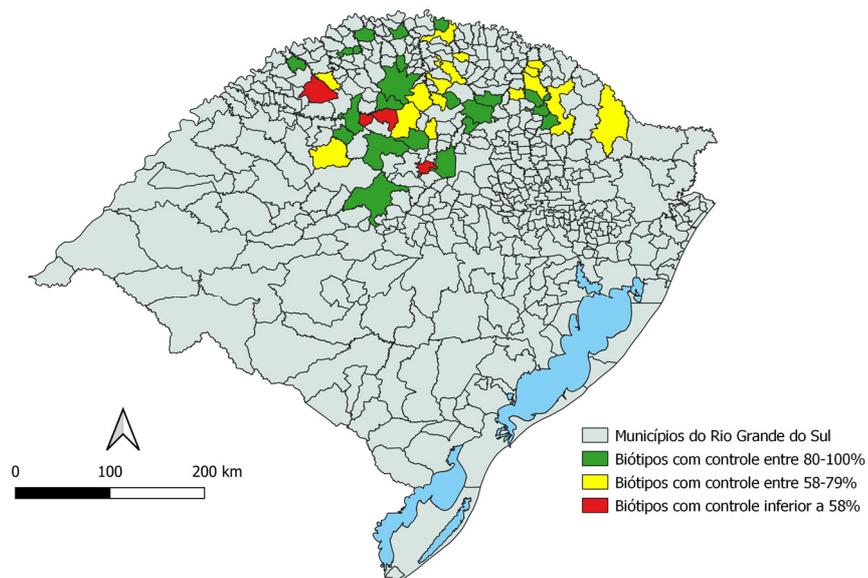


Figura 2- Localização geográfica dos biótipos de *Euphorbia heterophylla*. Pontos verdes representam controle entre 80-100%, amarelos 58-79% e vermelhos inferiores a 58%, em função da aplicação de  $100,8 \text{ g ha}^{-1}$  do herbicida tembotrione. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2019. Municípios com mais de uma amostra foram classificados no mapa coroplético com a cor correspondente ao biótipo que apresentou menor nível de controle.

O fato de existirem relatos de falhas de controle de leiteira pela aplicação de tembotrione, e o resultado desse estudo confirmar a ocorrência de escapes ao controle do herbicida, evidencia a necessidade de realizarem-se estudos para a

caracterização do problema. Desta forma, para realização dos demais estudos descritos neste documento, foi selecionado o biótipo 10.1 coletado em Condor-RS como suscetível e os biótipos 32.1 e 32.2 de Panambi-RS, como resistentes ao herbicida tembotrione. Os três biótipos foram escolhidos por representarem a mesma região geográfica, a fim de minimizar a resposta do ambiente e atribuir a resposta diferencial de controle proporcionada pelo herbicida tembotrione devido a evolução genética da espécie à resistência.

Os herbicidas exercem elevada pressão de seleção nas populações de plantas daninhas, e a densidade e diversidade das comunidades infestantes mudam com o tempo em resposta aos herbicidas e outras práticas de controle adotadas. O uso repetido e exclusivo de herbicidas com os mesmos mecanismos de ação pode rapidamente selecionar plantas daninhas tolerantes e de difícil controle, bem como a evolução de plantas daninhas resistentes, especialmente na ausência do uso simultâneo de herbicidas de diferentes mecanismos de ação, associado a outras práticas do manejo integrado de plantas daninhas (VENCILL et al., 2012).

Tabela 2- Localização e percentual de controle de biótipos de *Euphorbia heterophylla* em função da aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>) avaliados aos 30 dias após o tratamento (DAT). Capão do Leão, RS, 2019.

Biótipo	Cidade	Coordenadas Geográficas		Controle (%)
		Latitude	Longitude	
1.1	Almirante Tamandaré do Sul	28°06'15"	52°58'44"	68,7 b
2.1	Augusto Pestana	28°31'23"	54°01'07"	93,7 a
3.1	Boa Vista das Missões	27°38'01"	53°20'07"	100,0 a
4.1	Bom Progresso	27°34'42"	53°52'01"	100,0 a
5.1	Bozano	28°21'41"	53°45'18"	25,0 c
6.1	Campos Borges	28°51'19"	52°59'00"	25,0 c
7.1	Caseiros	28°17'18"	51°39'12"	81,5 a
8.1	Chapada	28°06'57"	53°00'53"	74,5 b
9.1	Colorado	28°30'21"	52°58'54"	78,5 b
10.1	Condor	28°14'00"	53°36'58"	85,3 a
11.1	Coqueiros do Sul	28°12'59"	52°45'54"	96,2 a
12.1	Coxilha	28°08'46"	52°14'31"	100,0 a
13.1	Cruz Alta	28°46'30"	53°35'08"	99,5 a
14.1	Cruzaltense	27°38'16"	52°41'00"	62,5 b
15.1	Engenho Velho	27°42'45"	52°54'55"	69,2 b
16.1	Ernestina	28°28'37"	52°33'24"	94,5 a
16.2	Ernestina	28°22'60"	52°31'31"	96,7 a
17.1	Espumoso	28°44'59"	52°52'58"	95,5 a
18.1	Frederico Westphalen	27°25'09"	53°25'49"	86,7 a
19.1	Giruá	27°57'36"	54°25'16"	44,0 c
19.2	Giruá	28°04'02"	54°24'45"	68,2 b

.....continua na próxima página

Biótipo	Cidade	Coordenadas Geográficas		Controle (%)
		Latitude	Longitude	
20.1	Humaitá	27°33'42"	53°59'59"	100,0 a
21.1	Ibiaça	28°08'59"	51°41'36"	79,7 a
22.1	Ibiraíaras	28°18'22"	51°38'16"	99,7 a
22.2	Ibiraíaras	28°18'22"	51°38'16"	100,0 a
23.1	Ibirubá	28°38'08"	53°12'57"	100,0 a
24.1	Ijuí	28°26'16"	53°56'30"	100,0 a
24.2	Ijuí	28°23'39"	53°58'13"	85,0 a
24.3	Ijuí	28°29'11"	53°50'20"	97,7 a
25.1	Independência	27°49'20"	54°12'06"	58,2 b
26.1	Jóia	28°42'18"	54°18'27"	78,0 b
27.1	Julio de Castilhos	29°09'10"	53°39'23"	85,0 a
27.2	Júlio de Castilhos	29°17'60"	53°40'09"	85,5 a
28.1	Lagoa Vermelha	28°12'37"	51°36'31"	72,7 b
29.1	Nonoai	27°18'13"	52°45'03"	76,0 b
29.2	Nonoai	27°27'50"	52°48'33"	66,0 b
30.1	Paim Filho	27°41'35"	51°46'58"	69,2 b
31.1	Palmeira das Missões	27°53'26"	53°16'25"	85,7 a
32.1	Panambi	28°17'46"	53°25'59"	49,2 c
32.2	Panambi	28°26'02"	53°29'60"	43,7 c
32.3	Panambi	28°19'59"	53°39'59"	100,0 a
33.1	Passo Fundo	28°10'46"	52°30'43"	97,7 a
34.1	Rio dos Índios	27°17'32"	52°51'19"	96,7 a
35.1	Ronda Alta	27°51'36"	52°46'21"	76,7 b
35.2	Ronda Alta	27°50'16"	52°46'41"	100,0 a
36.1	Sananduva	27°54'03"	51°49'14"	58,7 b
37.1	Santa Bárbara do Sul	28°22'60"	53°21'54"	72,5 b
38.1	São João da Urtiga	27°47'06"	51°49'18"	71,5 b
39.1	Sarandi	27°54'12"	52°51'09"	77,7 b
39.2	Sarandi	28°02'48"	52°56'18"	100,0 a
40.1	Tapejara	28°04'10"	51°54'53"	71,5 b
41.1	Tenente Portela	27°22'24"	53°46'51"	97,0 a
42.1	Tuparendi	27°45'59"	54°29'10"	83,2 a
43.1	Vacaria	28°01'46"	51°00'59"	75,2 b
CV (%)		21,3		

Biótipos com a mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scottknott ( $p \leq 0,05$ )

A resistência a herbicidas é amplamente reconhecida como resultado da evolução adaptativa das populações das plantas daninhas à intensa pressão de seleção exercida pelos herbicidas (DÉLYE et al., 2013). Os indivíduos menos suscetíveis têm uma vantagem seletiva em populações de plantas daninhas tratadas repetidamente com o mesmo herbicida e, portanto, aumentam em frequência até predominarem no ambiente. Quanto maior a pressão de seleção exercida pelo herbicida, mais rápida tende a ser a mudança nas proporções entre os biótipos (DÉLYE et al., 2013).

Espécies com altos níveis de polinização cruzada têm maior probabilidade de acumular mecanismos de resistência (a um único herbicida ou a vários herbicidas), e esse processo pode ocorrer mais rapidamente do que em espécies autopolinizadas (GAINES et al., 2020). Todavia, para que se possa confirmar a resistência, estudos apropriados devem ser desenvolvidos, como de curvas de dose-resposta e determinação do fator de resistência (BURGOS et al., 2013; HEAP, 2021; GAZZIERO et al., 2014). Neste sentido, os biótipos selecionados foram submetidos a curvas dose-resposta para comprovar a existência da resistência a HPPD, bem como a resistência múltipla a mecanismos de ação nos quais já são documentados a existência de biótipos de leiteira resistentes.

### **2.3.2 Identificação da resistência múltipla e cruzada**

A análise dos resultados obtidos nos experimentos de curva de dose-resposta evidenciou não ser necessária a transformação dos dados, com base nos testes de Shapiro-Wilk e Hartley. A análise da variância indicou ocorrer interação entre os fatores testados para todas as variáveis analisadas, e também se observou comportamento sigmoidal ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis controle e MSPA, com valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) variando entre 0,96 a 0,99 (Figuras 3 a 12), demonstrando ajuste satisfatórios dos dados ao modelo.

Os biótipos de leiteira apresentaram resposta diferencial à exposição de doses crescentes do herbicida tembotrione. Dois dias após o tratamento (DAT), os biótipos resistentes e suscetível demonstraram sintomas de branqueamento no meristema apical e folhas jovens, no entanto apenas o biótipo suscetível apresentou evolução para necrose de todas as folhas aos 8-9 DAT, na dose de registro do herbicida (100,8 g ha<sup>-1</sup>), enquanto os biótipos resistentes apresentaram injúrias moderadas próximo a 40% (dados não apresentados). Aos 30 DAT foi observado maior percentual de controle do biótipo de leiteira 10.1, no intervalo de doses de tembotrione compreendidas entre 25,2 e 806,4 g ha<sup>-1</sup>, em comparação aos biótipos 32.1 e 32.2, sendo esse efeito diminuído nas maiores doses (1612,8 e 3225,6 g ha<sup>-1</sup>) empregadas (Figura 3).

O biótipo suscetível apresentou controle superior a 80% na dose de 100,8 g ha<sup>-1</sup>, enquanto para os biótipos resistentes o controle foi inferior a 55%, necessitando o incremento de oito vezes a dose para alcançar o percentual de controle próximo a

80%. Resultados semelhantes foram encontrados em *Amaranthus tuberculatus* onde o biótipo resistente necessitou o incremento de 4,7 vezes a dose de tembotrione para alcançar o mesmo nível de controle que o biótipo suscetível (OLIVEIRA et al., 2017b), sendo que na dose de registro, tembotrione, mesotrione, e topramezone apresentaram controle inferior a 60% nos biótipos resistentes (MCMULLAN e GREEN, 2011).

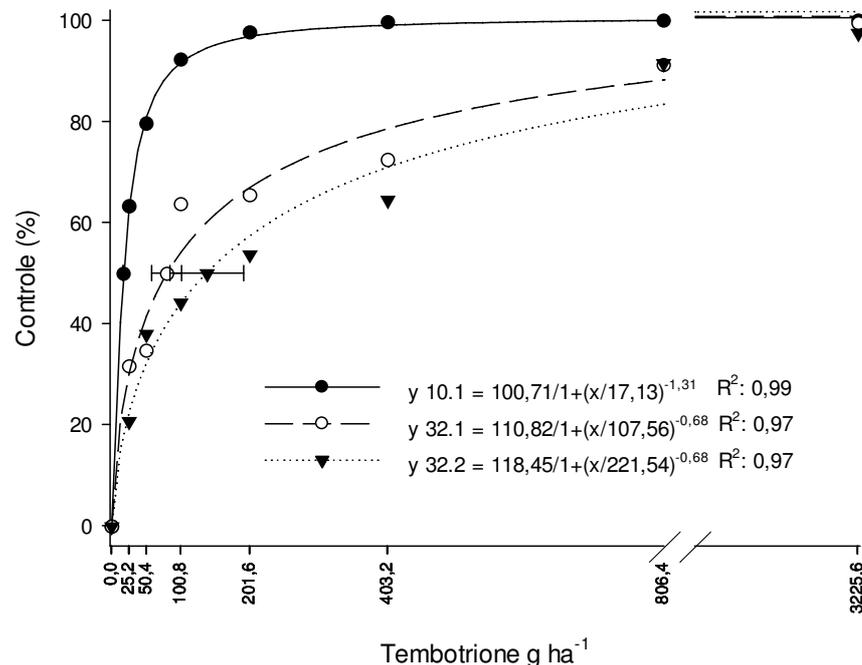


Figura 3- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a tembotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2019. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).

Os dados de redução da MSPA suportam as observações de controle visual aos 30 DAT (Figura 4). O tratamento dos biótipos 10.1, 32.1 e 32.2 com doses crescentes de tembotrione resultou no comportamento típico de uma curva dose-resposta, através da diminuição da MSPA com o aumento das doses. No entanto, a MSPA do biótipo suscetível foi reduzida em mais de 90% com 100,8 g ha<sup>-1</sup> de tembotrione, enquanto esta mesma dose reduziu a MSPA dos biótipos resistentes (32.1 e 32.2) em aproximadamente 60%.

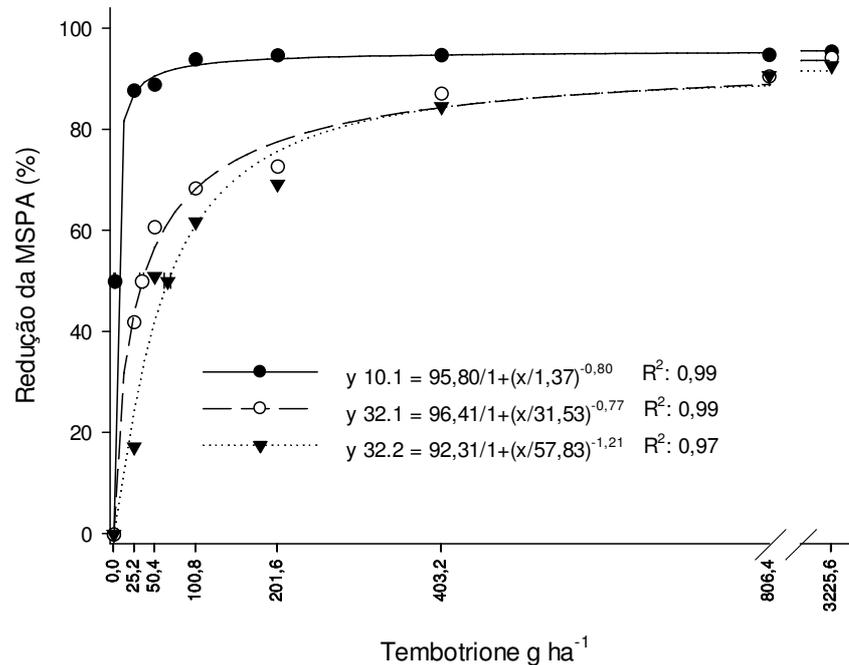


Figura 4- Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a tembotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2019. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).

Para o herbicida mesotrione, na avaliação de controle aos 30 DAT o biótipo 10.1 apresentou controle visual acima de 85% a partir da dose de 96 g ha<sup>-1</sup> (50% da dose de registro para o controle de leiteira), enquanto os biótipos resistentes (32.1 e 32.2) exibiram controle aproximado de 18% (Figura 5). Para alcançar controle acima de 80% nos biótipos resistentes, foram necessárias 1536 g ha<sup>-1</sup> de mesotrione, ou seja, 8 vezes a dose normalmente aplicada em condições de campo.

Na avaliação de redução da MSPA, verificou-se comportamento de declínio nas curvas sigmoidais, indicando que o aumento na dose do herbicida mesotrione (Figura 6) para ambos os biótipos reduziu o acúmulo de MSPA. No entanto, esta redução foi mais pronunciada no biótipo suscetível, o qual estabilizou a redução da MSPA em níveis acima de 90% a partir da dose de 384 g ha<sup>-1</sup> de mesotrione, enquanto os biótipos resistentes alcançaram o platô a partir de 1536 g ha<sup>-1</sup>, ou seja, foi necessário o incremento de 4 vezes na dose do produto para alcançar respostas equivalentes.

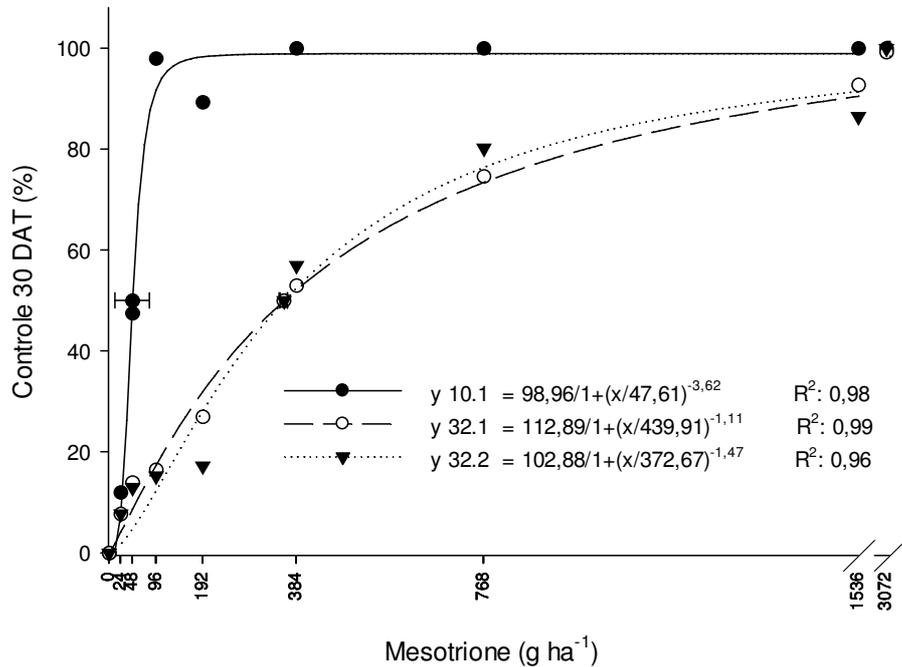


Figura 5- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a mesotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).

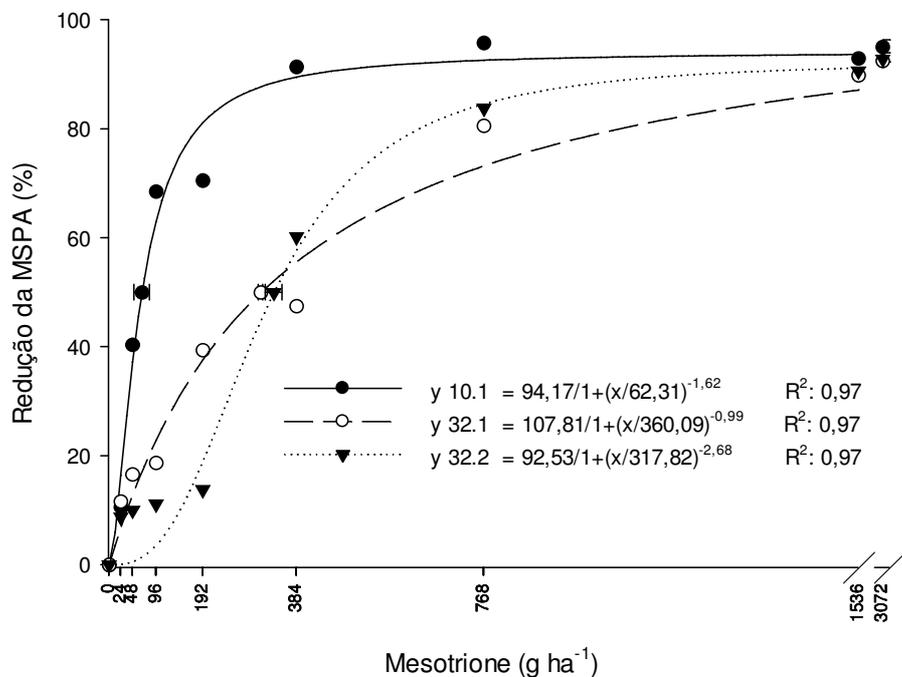


Figura 6- Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a mesotrione, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).

Em biótipos de *A. tuberculatus* foram observados resultados semelhantes, onde para o mesmo nível de controle entre biótipos suscetíveis e resistentes foi necessário o incremento de 4 a 16 vezes a dose mesotrione (EVANS et al., 2019). Da mesma forma para *Raphanus raphanistrum*, a dose necessária para o controle de 50% da população resistente com mesotrione, foi 5,5 vezes superior à população suscetível aos inibidores da HPPD (LU et al., 2020).

Isoxaflutole é um herbicida pré-emergente registrado no Brasil para o manejo de plantas daninhas em algodão, batata, cana-de-açúcar, mandioca e milho. Este herbicida não apresenta registro para o controle de leiteira nestas culturas, mas foi utilizado neste trabalho para verificar a existência de resposta diferencial entre os biótipos resistentes e suscetível a um herbicida inibidor da HPPD pertencente ao grupo químico isoxazol, diferente dos herbicidas tembotrione e mesotrione que são classificados como tricetonas.

Para a variável controle, os biótipos de leiteira apresentaram comportamento distinto em função da aplicação de doses crescentes de isoxaflutole (Figura 7). O biótipo 10.1 demonstrou controle superior, com menores doses de isoxaflutole em comparação aos biótipos 32.1 e 32.2. Por exemplo, na dose de 225 g ha<sup>-1</sup> enquanto o biótipo 10.1 atingiu controle próximo a 85%, os biótipos 32.1 e 32.2 demonstraram controle de 59 e 67% respectivamente. Isoxaflutole é aplicado em uma faixa de dose variando de 30 a 262,5 g ha<sup>-1</sup> (AGROFIT, 2021). Essa variação de dose depende da cultura, planta daninha e modalidade de aplicação. No entanto, mesmo com a maior dose registrada, os biótipos 32.1 e 32.2 não seriam eficientemente controlados, considerando controle satisfatório quando acima de 80%.

Apesar de isoxaflutole não apresentar registro para o controle de leiteira (AGROFIT, 2021), os biótipos resistentes e suscetíveis apresentam comportamento similar aos herbicidas do grupo químico das tricetonas. No entanto, a diferença de controle entre biótipos resistentes e suscetível com o incremento de doses é menor com isoxaflutole. Resultados similares foram observados em *R. raphanistrum* resistente aos inibidores da HPPD via metabolização acelerada, onde observou-se que os biótipos resistentes conseguiam sobreviver a doses mais elevadas de mesotrione e tembotrione em comparação a isoxaflutole (LU et al., 2020). Similar resposta foi observada em *A. tuberculatus*, em que as plantas demonstraram elevada resistência à mesotrione (18×), seguido por tembotrione (6×) e topramezone (2×)

(KAUNDUN et al., 2017). Topramezone pertence ao grupo químico dos pirazóis, dos quais não existem herbicidas comercialmente disponíveis no Brasil.

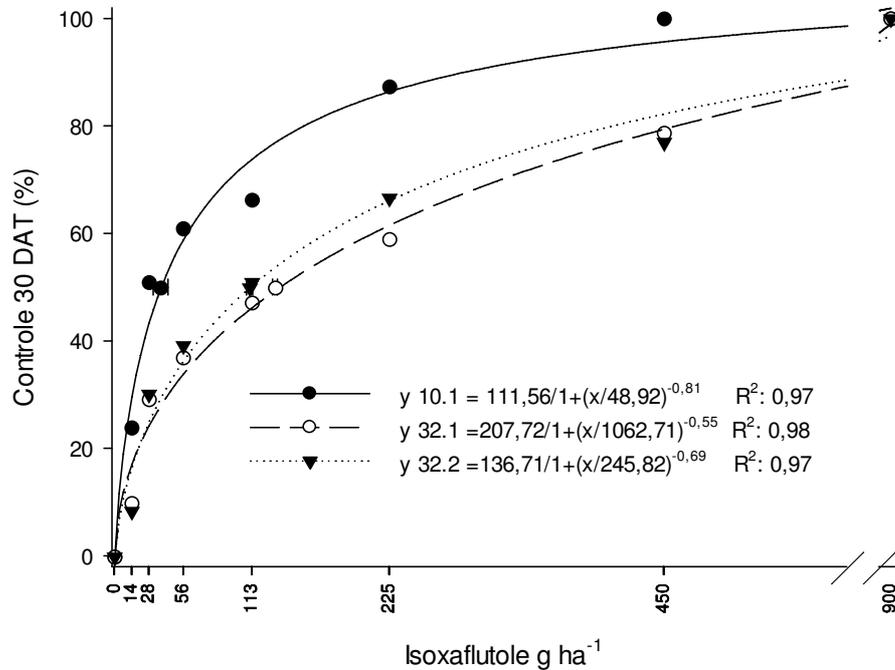


Figura 7- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a Isoxaflutole, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).

Em relação a redução da MSPA, após a exposição de doses crescentes de isoxaflutole pode-se observar uma maior redução em menores doses no biótipo 10.1 em comparação aos biótipos 32.1 e 32.2 (Figura 8). Similarmente ao que ocorreu ao controle aos 30 DAT, o acúmulo de MSPA seguiu a mesma tendência, no entanto menores doses, proporcionaram maior redução em comparação ao controle aos 30 DAT. Isso ocorreu porque as plantas não foram 100% controladas nas doses intermediárias do herbicida e emitiram novas brotações, nas quais apresentaram peso seco reduzido, quando comparado a tecidos desenvolvidos.

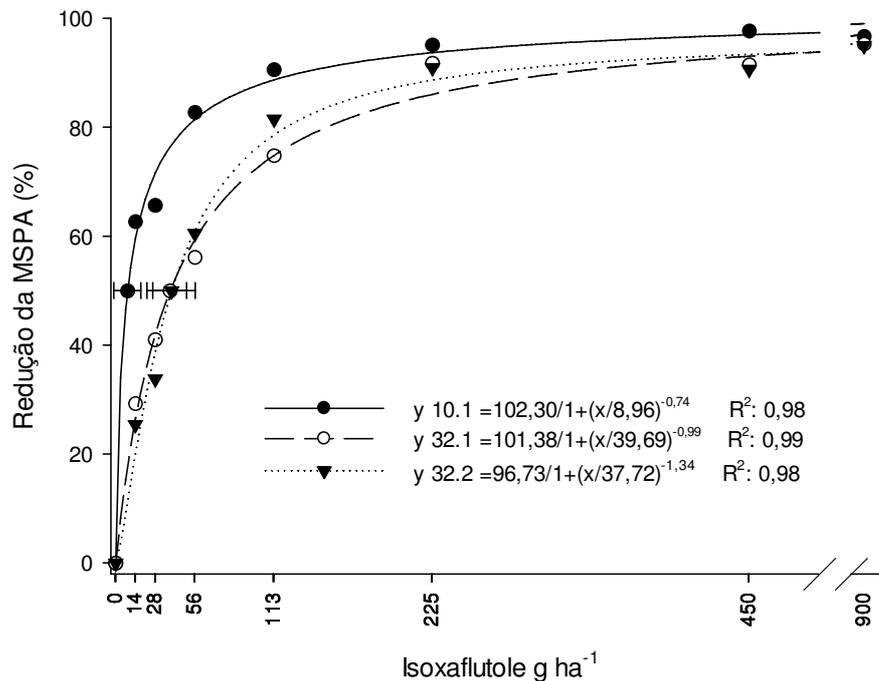


Figura 8- Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) com suspeita de resistência a isoxaflutole, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ).

A curva dose-resposta dos biótipos resistentes a HPPD com fomesafem e imazetapir foi construída para verificar a existência de resistência múltipla a Protox e ALS, respectivamente. Os biótipos resistentes e suscetível aos inibidores da HPPD responderam de forma diferencial à aplicação de doses crescentes de fomesafem (Figura 9). O biótipo 10.1 demonstrou maior controle com menores doses em comparação aos biótipos 32.1 e 32.2. Na dose de registro de 250 g ha<sup>-1</sup> enquanto os biótipos 32.1 e 32.2 demonstraram injúrias próximo a 40%, o biótipo suscetível foi totalmente controlado. Biótipos de leiteira resistentes aos inibidores da Protox estão dispersos em várias regiões do sul do Brasil, como consequência da resistência de leiteira aos inibidores da ALS em soja convencional em 1998 e o uso de lactofen e fomesafem para o manejo destes biótipos resistentes (MENDES et al., 2020b; TREZZI et al., 2011; TREZZI et al., 2006).

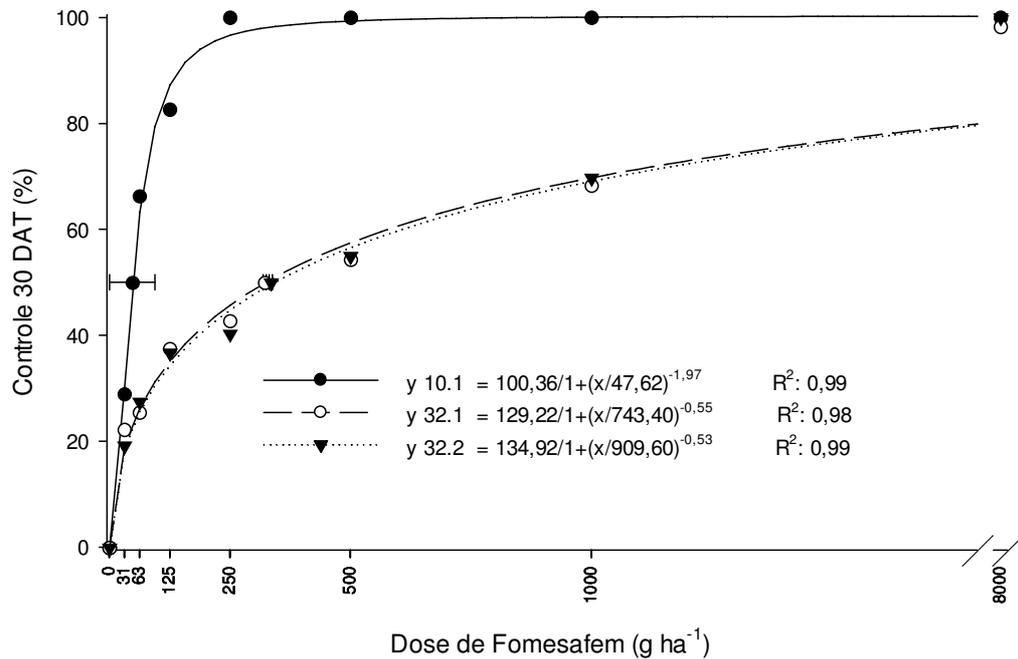


Figura 9- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em função da aplicação fomesafem, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Os dados de redução da MSPA (Figura 10) em resposta à aplicação de doses crescentes de fomesafem corroboram com os dados de controle. Para o biótipo 10.1, 125 g ha<sup>-1</sup> são suficientes para reduzir o acúmulo de massa seca acima de 80%, enquanto para os biótipos resistentes foram necessárias doses acima de 4000 g ha<sup>-1</sup>. Resultados similares foram observados em biótipos de leiteira com suspeita de resistência aos inibidores da Protox, onde a dose de 800 g ha<sup>-1</sup> fomesafem causou poucas injúrias nos biótipos considerados resistentes, enquanto o suscetível foi controlado 100% (TREZZI et al., 2011).

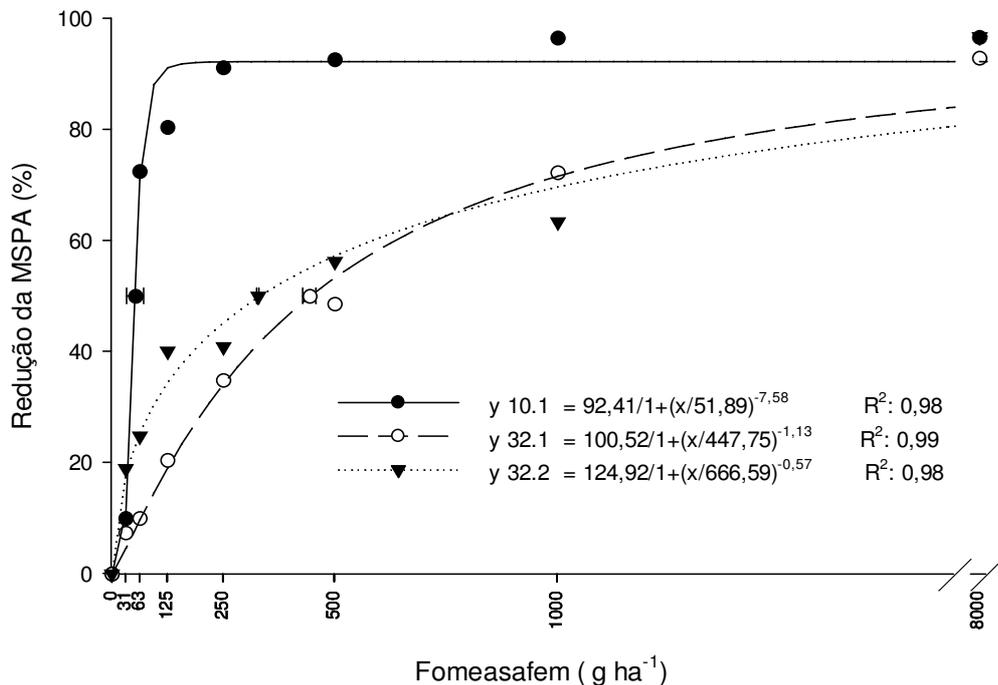


Figura 10- Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) expostos a fomesafem, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Em relação à resistência múltipla aos inibidores da ALS foi possível observar que o biótipo 32.1 demonstrou resposta diferencial em relação aos demais biótipos testados ao aumento de doses do herbicida imazetapir (Figura 11). Para este biótipo, o aumento em 32 vezes na dose de registro, acarretou em pequena variação no percentual de controle, de pouco menos 35 alcançando o máximo de 58% na maior dose testada (3200 g e.a. ha<sup>-1</sup>). Por outro lado, os biótipos 10.1 e 32.2, apresentaram resultado similar, alcançando controle satisfatório com doses de imazetapir acima de 100 g e.a. ha<sup>-1</sup>.

Os primeiros casos de resistência de leiteira aos inibidores da ALS, foram documentados em 1998 (GAZZIERO et al., 1998). Os inibidores da ALS eram os principais herbicidas empregados para o controle de plantas daninhas em pré e pós-emergência na soja convencional, onde o uso continuado e repetido acarretou na seleção e evolução de leiteira e picão-preto a herbicidas deste mecanismo de ação. A liberação comercial da soja RR<sup>®</sup> (Roundup Ready) em 2005 acarretou no emprego massivo de glifosato para o controle de plantas daninhas. No entanto, a tolerância de leiteira a este herbicida, e controle insatisfatório em muitos casos, proporcionou que

biótipos de leiteira resistentes aos herbicidas inibidores da ALS permanecessem nas áreas agrícolas após longos períodos sem a aplicação de inibidores da ALS (VARGAS et al., 2013). No Rio Grande do Sul, a presença de leiteira resistente aos inibidores da ALS permanece nas mesorregiões Nordeste e Noroeste do Estado, ou seja, nos principais locais em que a soja convencional era cultivada na década de 90 (VARGAS et al., 2013), e onde os biótipos 10.1, 32.1 e 32.2 foram coletados.

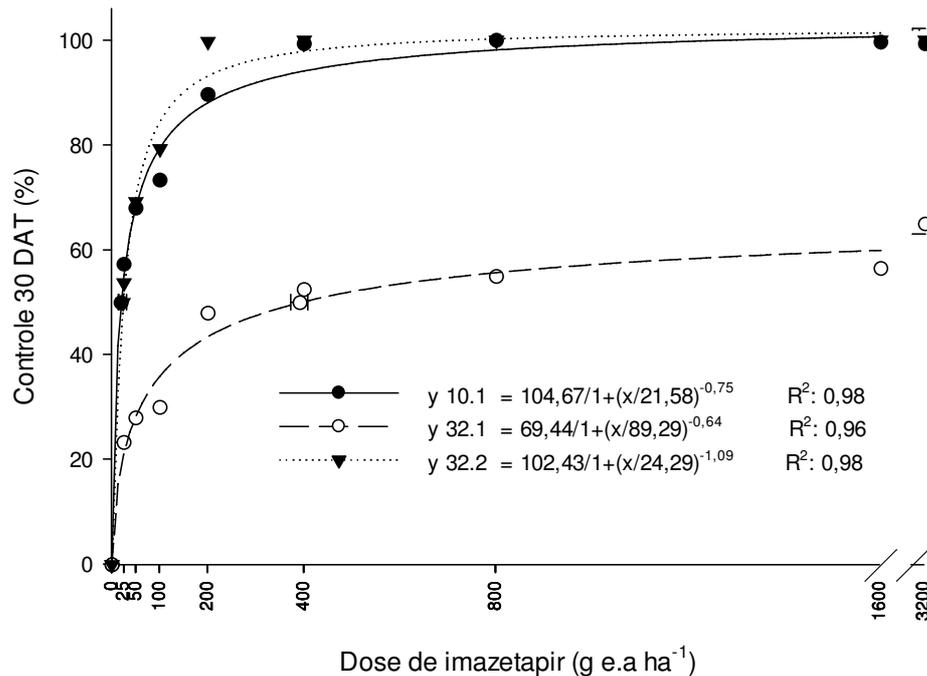


Figura 11- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em função da aplicação imazetapir, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Os dados de redução de MSPA corroboram com os dados de controle, uma vez que, os biótipos 10.1 e 32.2 demonstraram redução da MSPA superior a 75% com a dose de 100 g e.a. ha<sup>-1</sup> de imazetapir (Figura 12). A dose de 100 g e.a. ha<sup>-1</sup> de imazetapir, representa a dose de registro de uma série de produtos comerciais empregada para o controle de plantas daninhas na pós-emergência da cultura da soja (AGROFIT, 2021), desta forma, os biótipos 10.1 e 32.2 são suscetíveis à dose normalmente utilizada em condições de campo. Similar à avaliação de controle, o biótipo 32.1 demonstrou baixa resposta de redução da MSPA quando aumentadas as doses de imazetapir, onde o incremento de 400 para 3200 g e.a. ha<sup>-1</sup> proporcionou o incremento de menos de 3% na redução da MSPA.

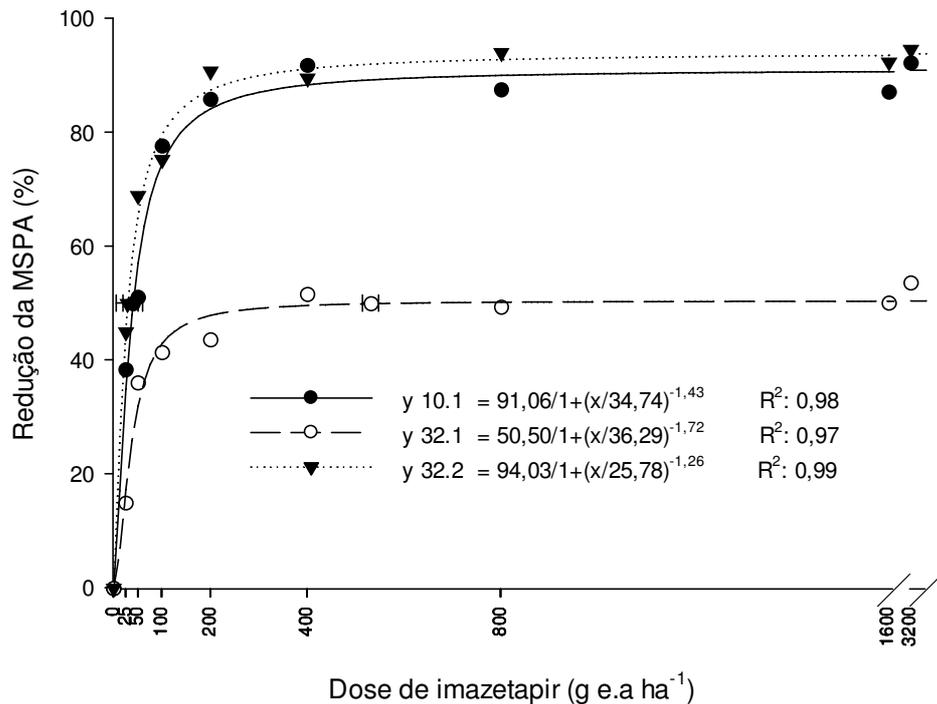


Figura 12- Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) expostos a imazetapir, aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida. Capão do Leão, RS, 2020. As barras horizontais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Após as avaliações de controle aos 30 DAT e de redução da MSPA, foram calculados a  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  para cada um dos herbicidas testados (Tabela 3). A  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  do biótipo 10.1 foi inferior aos biótipos resistentes (32.1 e 32.2) para os três inibidores da HPPD (tembotrione, mesotrione e isoxaflutole). Observou-se que o FR dos biótipos 32.1 e 32.2 foram significativos, evidenciado pela ausência de sobreposição dos intervalos de confiança em relação ao biótipo suscetível 10.1. Assim, para  $C_{50}$  foram obtidos FR de 4,8 e 8,2 para tembotrione; 7,5 e 7,5 para mesotrione e; 3,5 e 2,9 para isoxaflutole; respectivamente, para os biótipos 32.1 e 32.2. Para  $GR_{50}$ , os valores foram de 22,7 e 43,4 para tembotrione; 4,6 e 5,0 para mesotrione e; 4,6 e 4,7 para isoxaflutole; respectivamente, para os biótipos 32.1 e 32.2.

**Tabela 3-** Dose necessária para promover 50% de controle ( $C_{50}$ ) ou reduzir em 50% a produção de massa seca ( $GR_{50}$ ) com intervalos de confiança (IC), e fator de resistência de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em resposta à aplicação de diferentes herbicidas. Capão do Leão, RS, 2019/2020.

Tembotrione controle aos 30 DAT			
Biótipo	$C_{50}/GR_{50}^1$	IC ( $p \geq 0,95$ )	FR
10.1	16,9	16,6-17,2	-
32.1	80,6	58,6-102,3	4,8
32.2	139,2	85,1-193,3	8,2
Tembotrione MSPA			
10.1	1,5	0,5-2,5	-
32.1	34,7	32,5-37,8	22,7
32.2	66,4	62,4-70,4	43,4
Mesotrione controle aos 30 DAT			
10.1	47,9	12,5-83,3	-
32.1	357,8	348,9-366,6	7,5
32.2	358,6	351,5-366,08	7,5
Mesotrione MSPA			
10.1	67,3	51,5-82,9	-
32.1	311,0	261,8-360,2	4,6
32.2	337,6	320,3-354,8	5,0
Isoxaflutole controle aos 30 DAT			
10.1	37,8	33,5-42,1	-
32.1	131,6	130,8-132,4	3,5
32.2	110,7	109,0-112,4	2,9
Isoxaflutole MSPA			
10.1	8,4	0,1-18,0	-
32.1	38,6	26,6-50,6	4,6
32.2	39,6	22,5-56,8	4,7
Fomesafem controle aos 30 DAT			
10.1	47,4	0,5-94,4	-
32.1	322,0	318,9-325,1	6,8
32.2	335,0	331,5-338,5	7,1
Fomesafem MSPA			
10.1	53,0	33,8-72,2	-
32.1	443,8	428,9-458,6	8,4
32.2	328,0	325,6-330,4	6,4
Imazetapir controle aos 30 DAT			
10.1	19,1	13,5-24,8	-
32.1	391,0	388,8-393,2	20,4
32.2	23,3	15,2-31,2	-
Imazetapir MSPA			
10.1	39,9	19,6-60,1	-
32.1	531,0	514,2-547,8	13,3
32.2	28,5	5,8-51,3	-

<sup>1</sup> $C_{50}$  relativo à variável controle aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), e  $GR_{50}$  relativo à variável massa seca aos 30 DAT.

Os valores de FR observados no presente estudo são semelhantes aos observados em casos de resistência a tembotrione em *Amaranthus palmeri* onde FR para  $C_{50}$  obtido no biótipo resistente variou de 3,3 a 2,9 (KÜPPER et al., 2017). Já para  $GR_{50}$ , foram observados biótipos variando o FR de 1,76 a 17,8 (NAKKA et al.,

2017). Similarmente para *Amaranthus tuberculatus* foram verificados FR de 6 para tembotrione, 13 para mesotrione e 3 para topramezone calculados a partir da  $C_{50}$  (OLIVEIRA et al., 2017b). Em *Raphanus raphanistrum* foram observados FR de 6,5; 5,5 e 4, para tembotrione, mesotrione e isoxaflutole, respectivamente (LU et al., 2020).

Na avaliação de resistência múltipla foi verificado para fomesafem FR de 6,8 e 7,1 para  $C_{50}$ ; e 8,4 e 6,4 para  $GR_{50}$  para os biótipos 32.1 e 32.2 respectivamente (Tabela 3). Para imazetapir foram calculados os FR somente para o biótipo 32.1, uma vez que, este biótipo foi o único a perfazer o critério de não sobrepor o intervalo de confiança com o biótipo suscetível. Assim, os FR de resistência obtidos foram de 20,4 e 13,3, respectivamente para  $C_{50}$  e  $GR_{50}$ .

A partir dos resultados obtidos nas curvas-dose repostas, das  $C_{50}$ , das  $GR_{50}$  e FRs, pode-se verificar que os biótipos 32.1 e 32.2 apresentam resistência cruzada aos inibidores da HPPD (tembotrione, mesotrione e isoxaflutole). Além disso, pode-se constatar resistência múltipla do biótipo 32.2 aos inibidores Protox e do biótipo 32.1 aos inibidores da Protox e da ALS.

### **2.3.3 Controle alternativo**

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Hartley), os quais evidenciaram não haver a necessidade de transformação dos dados. Os resultados da análise de variância demonstraram diferença significativa para todas as variáveis analisadas e interação entre os fatores biótipos e herbicidas (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

A atrazina, herbicida inibidor do fotossistema II (FSII), demonstrou controle satisfatório ( $\geq 97\%$ ), reduzindo quase integralmente o acúmulo de MSPA de todos os biótipos, incluindo aqueles com resistência múltipla aos inibidores da HPPD, Protox e ALS (Tabelas 4 e 5). Esse herbicida apresenta amplo espectro de controle, podendo ser utilizado em cana-de-açúcar, milho e sorgo na pré e pós emergência inicial das culturas e das plantas daninhas (AGROFIT, 2021). Assim, a atrazina pode ser uma importante ferramenta de manejo de leiteira em áreas de soja com casos de resistência a herbicidas, onde a rotação com culturas tolerantes ao herbicida possa ser realizada.

Tabela 4- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em função da aplicação de diferentes herbicidas pré-emergentes aos 30 dias após a emergência. Capão do Leão, RS, 2020.

Tratamento	Controle (%)					
	Biótipo 10.1		Biótipo 32.1		Biótipo 32.2	
Testemunha	0,0	Ae <sup>1</sup>	0,0	Ad	0,0	Ae
Atrazina	98,7	Aab	97,0	Aa	98,7	Aa
Clomazone	59,5	Ad	46,6	Ac	46,7	Ad
Diclosulam	92,7	Ab	74,7	Bb	88,0	Ab
Flumetsulam	83,7	Ac	40,3	Bc	82,7	Ac
Flumioxazina	96,2	Aab	94,5	Aa	91,0	Ab
Fomesafem	97,2	Aab	93,5	Aa	99,0	Aa
Isoxaflutole	99,2	Aa	96,5	Aa	98,5	Aa
Sulfentrazone	98,5	Aab	99,5	Aa	100,0	Aa
C.V.(%) <sup>2</sup>	7,00					

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha comparando biótipos de leiteira com mesmo herbicida não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna comparando herbicidas para mesmo biótipo de leiteira não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). <sup>2</sup>CV: Coeficiente de variação.

O herbicida clomazone demonstrou resposta de controle variando entre 46,6 a 59,5% e redução da MSPA equivalente entre os biótipos de leiteira testados (Tabela 4 e 5). Este herbicida apresenta amplo espectro, no entanto é mais eficiente no controle de gramíneas (MACHADO et al., 2016). Apesar do clomazone inibir a biossíntese de carotenoides, assim como os inibidores da HPPD, essa inibição ocorre em etapas diferentes, configurando mecanismos de ação distinto. Nas plantas clomazone é metabolizado a 5-ceto clomazone, que se liga à enzima 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DOXP), inibindo a síntese do primeiro composto intermediário da rota não-mevalonato (FERHATOGLU; BARRETT, 2006). Por outro lado, a enzima HPPD está envolvida em uma etapa complementar do metabolismo da tirosina, que sintetiza homogentisato (DAYAN, 2019). Homogentisato se liga à solanil difosfato, produto da rota não-mevolonato, via solanesil homogentisato transferase, sintetizando plastoquinona (DAYAN, 2019).

A inibição da HPPD interrompe a síntese de carotenoides, pela ausência de plastoquinona como doador de elétrons para a fitoeno desaturase (LEE et al., 1998). A resposta similar entre os biótipos suscetíveis e resistentes a HPPD à aplicação de clomazone, pode indicar que os efeitos relacionados a inibição da síntese dos carotenoides não estão relacionados ao mecanismo de resistência a HPPD nos biótipos estudados, mas sim as etapas anteriores ao efeito fitotóxico do herbicida.

Os herbicidas inibidores da ALS, diclosulam e flumetsulam apresentaram maior redução da MSPA e controle superior, variando entre 20 a 52%, nos biótipos

suscetíveis ao inibidor da ALS imazetapir (10.1 e 32.2), em comparação ao biótipo 32.1, que demonstrou ser resistente no ensaio de curva dose-resposta (Tabela 4 e 5). A substituição no gene ALS do aminoácido serina na posição 653 para uma aspargina em leiteira, comprometeu a eficácia dos 5 grupos químicos de inibidores da ALS, nos quais incluem as imidazolinonas, sulfoniluréias, triazolopirimidinas, pirimidinil(tio)benzoatos e sulfonil amino-carbonil-triazolinonas, acarretando em níveis de resistência que variam entre os grupos químicos, com fatores de resistência variando de 2 a 524,7 (ROJANO -DELGADO et al., 2019).

Os herbicidas pré-emergentes flumioxazina, fomesafem e sulfentrazone (inibidores da Protox) demonstraram controle e redução da MSPA satisfatório, acima de 90% em todos os biótipos testados (Tabela 4 e 5). Para estes herbicidas não ocorreram diferenças de controle entre os biótipos suscetível 10.1 e os resistentes a Protox 32.1 e 32.2. Esses resultados são similares a outras populações de *E. heterophylla* resistentes a Protox do Brasil, onde mesmo com alto FR para fomesafem (39 e 62 vezes) foram controladas satisfatoriamente com sulfentrazone (600 g ha<sup>-1</sup>) e flumioxazina (50 g ha<sup>-1</sup>) em pré emergência (TREZZI et al. 2005). Fomesafem também demonstrou ser mais eficiente no controle de plantas de leiteira resistentes à Protox quando aplicado em pré emergência, do que quando aplicado em pós emergência, levantando a hipótese do local de absorção como mecanismo de resistência de leiteira a fomesafem (TREZZI et al. 2009).

O herbicida isoxaflutole demonstrou controle satisfatório, acima de 96,5% e similar redução de MSPA para todos os biótipos de leiteira, incluindo os resistentes a HPPD, na aplicação realizada em pré emergência (262 g ha<sup>-1</sup>) (Tabela 4 e 5). Este resultado pode estar atrelado à dose empregada, uma vez que, em pós emergência (curva dose-resposta) a dose empregada em pré emergência apresentou controle próximo a 60% nos biótipos resistentes a HPPD (32.1 e 32.2). Outros fatores que podem ter contribuído para a ausência de diferença entre biótipos R e S é que o fator de resistência a isoxaflutole é menor quando comparado a tembotrione e mesotrione, ou a fase inicial de estabelecimento das plantas é mais suscetível à aplicação de herbicidas, em comparação a plantas já desenvolvidas, bem como, esse comportamento diferencial pode estar atrelado ao mecanismo de resistência a HPPD. Resultados similares, de maior eficiência em pré-emergência, em casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas que apresentam efeito em pré quanto em pós

emergência, foram observados em leiteira resistente a fomesafem (TREZZI et al. 2009) e capim-arroz resistente a ALS (RAFAELI et al., 2019).

Tabela 5- Massa seca da parte aérea (MSPA) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) em função da aplicação de diferentes herbicidas pré-emergentes aos 30 dias após a emergência. Capão do Leão, RS, 2020.

Tratamento	MSPA (g vaso <sup>-1</sup> )					
	Biótipo 10.1		Biótipo 32.1		Biótipo 32.2	
Testemunha	1,43	Ba <sup>1</sup>	2,27	ABa	3,02	Aa
Atrazina	0,01	Ac	0,01	Ad	0,01	Ae
Clomazone	0,69	Ab	1,07	Ac	1,21	Ab
Diclosulam	0,20	Bc	0,70	Ac	0,29	ABc
Flumetsulam	0,35	Bbc	1,55	Ab	0,40	Bc
Flumioxazina	0,18	Ac	0,20	Ad	0,23	Acd
Fomesafem	0,02	Bc	0,10	Ad	0,02	Be
Isoxaflutole	0,02	Ac	0,04	Ad	0,06	Ae
Sulfentrazone	0,02	Ac	0,00	Ad	0,00	Ae
C.V.(%) <sup>2</sup>			54,18			

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha comparando biótipos de leiteira com mesmo herbicida não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna comparando herbicidas para mesmo biótipo de leiteira não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ).<sup>2</sup>CV: Coeficiente de variação.

Na aplicação realizada em pós-emergência os herbicidas inibidores da ALS, cloransulam metílico, clorimurom etílico, metsulfurom metílico e nicosulfurom foram ineficientes no controle e redução do acúmulo de MSPA do biótipo resistente a ALS 32.1 (Tabelas 6 e 7). Cloransulam metílico e clorimurom etílico apresentaram controle inferior a 60%, inclusive nos biótipos suscetíveis aos inibidores da ALS (10.1 e 32.2). Por outro lado, metsulfurom metílico e nicosulfurom demonstraram controle adequado dos biótipos suscetíveis, com percentuais acima de 97,5%.

O biótipo 32.1 apresentou resistência cruzada aos inibidores da ALS, incluindo os grupos químicos das imidazolinonas (imazetapir), triazolopirimidinas (cloransulam metílico) e sulfunilureias (clorimurom etílico, metsulfurom metílico e nicosulfurom). Esses resultados indicam que a mutação no gene ALS, selecionada em soja convencional na década de 90 remanesce nas populações atuais, mesmo com a redução do uso destes herbicidas, em virtude da liberação comercial de soja RR<sup>®</sup> (GAZZIERO et al., 1998; VARGAS et al., 2013; ROJANO-DELGADO et al., 2019).

Tabela 6- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) aos 30 dias após a aplicação de diferentes herbicidas pós-emergentes. Capão do Leão, RS, 2020.

Tratamento	Controle (%)					
	Biótipo 10.1		Biótipo 32.1		Biótipo 32.2	
Testemunha	0,0	Ae <sup>1</sup>	0,0	Af	0,0	Ae
Cloransulam metílico	51,2	Ac	7,5	Bde	60,5	Ac
Clorimurrom etílico	50,5	Ac	5,0	Bdef	49,2	Ad
Metsulfurom metílico	99,5	Aa	12,6	Bc	97,5	Aa
Nicosulfurom	99,7	Aa	9,3	Bcd	99,7	Aa
Atrazina	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
Bentazona	3,7	Ad	4,0	Aef	4,0	Ae
Paraquat	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
Paraquat + diuron	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
Saflufenacil	99,7	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
Glifosato	100,0	Aa	100,0	Aa	96,2	Aa
Amônio glufosinato	100,0	Aa	96,2	Aa	95,5	Aa
2,4-D	83,3	Ab	83,0	Ab	83,2	Ab
C.V.(%) <sup>2</sup>			4,82			

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha comparando biótipos de leiteira com mesmo herbicida não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna comparando herbicidas para mesmo biótipo de leiteira não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). <sup>2</sup>CV: Coeficiente de variação.

Os inibidores do FII atrazina e bentazona apresentaram controle e redução da MSPA similar entre os três biótipos testados (Tabela 6 e 7). No entanto, somente atrazina apresentou redução satisfatória da MSPA dos biótipos, alcançando o controle total, enquanto a bentazona demonstrou controle inferior a 5% (Tabela 6 e 7). O paraquat, inibidor do fotossistema I (FSI), demonstrou controle e redução da MSPA satisfatórios de todos os biótipos de leiteira, seja na aplicação do produto isolado ou na mistura comercial com diuron, herbicida inibidor do FSII (Tabela 6 e 7).

Saflufenacil, herbicida inibidor da Protox, demonstrou controle satisfatório acima de 99,7%, para todos os biótipos de leiteira. Resultados opostos foram observados em biótipos de leiteira resistentes a inibidores da Protox, em função da mutação na PPO2 pela substituição da arginina na posição 128 por uma leucina, onde foi detectada resistência cruzada aos inibidores da Protox, incluindo saflufenacil, com fator de resistência de 8,6 vezes (MENDES et al., 2020b).

Glifosato, herbicida inibidor da enol-piruvil shiquimato fosfato sintase (EPSPs), e amônio glufosinato, inibidor da glutamina sintetase (GS), demonstraram controle adequado de todos os biótipos de leiteira, com percentuais de controle acima de 95,5%. O herbicida mimetizador de auxinas 2,4-D, apresentou controle pouco acima

do mínimo requerido em testes de eficiência e praticabilidade agrônômica ( $\geq 80\%$ ), sendo que todos os biótipos testados demonstraram suscetibilidade similar.

Tabela 7- Massa seca da parte aérea (MSPA) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) aos 30 dias após a aplicação de diferentes herbicidas pós-emergentes. Capão do Leão, RS, 2020.

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )					
	Biótipo 10.1		Biótipo 32.1		Biótipo 32.2	
Testemunha	1,67	Aa <sup>1</sup>	1,47	Ab	1,63	Aa
Cloransulam metílico	1,04	Bb	2,06	Aa	0,60	Bbc
Clorimurom etílico	1,54	Aa	1,31	Ab	1,07	Aab
Metsulfurom metílico	0,36	Bcd	1,66	Aab	0,20	Bc
Nicosulfurom	0,22	Bd	1,43	Ab	0,20	Bc
Atrazina	0,17	ABd	0,25	Ac	0,12	Bc
Bentazona	1,87	Aa	1,64	Aab	1,45	Aa
Paraquat	0,13	Ad	0,28	Ac	0,11	Ac
Paraquat + diuron	0,13	Ad	0,17	Ac	0,14	Ac
Saflufenacil	0,12	Ad	0,17	Ac	0,14	Ac
Glifosato	0,27	Ad	0,30	Ac	0,19	Ac
Amônio glufosinato	0,20	Ad	0,24	Ac	0,42	Ac
2,4-D	0,77	Abc	1,29	Ab	1,23	Aa
C.V.(%) <sup>2</sup>			45,47			

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha comparando biótipos de leiteira com mesmo herbicida não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna comparando herbicidas para mesmo biótipo de leiteira não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \geq 0,05$ ). <sup>2</sup>CV: Coeficiente de variação.

Os casos de leiteira resistentes a HPPD, Protox e ALS, descritos neste trabalho, associada à resistência ao glifosato (Mendes et al., 2020a), restringem fortemente as opções de controle de leiteira em pré e pós-emergência da cultura da soja. Desta forma, o planejamento de manejo da área, bem como a adoção de medidas de controle integrado são essenciais para o sucesso no manejo da espécie. A rotação de culturas, com a cultura do milho possibilita o emprego de atrazina, que demonstrou controle satisfatório de todos os biótipos tanto em pré quanto em pós-emergência, bem como, glufosinato de amônio pode ser uma alternativa em pós-emergência em cultivares com a tecnologia LibertyLink<sup>®</sup>.

Para o controle químico em pré-emergência da soja, os inibidores da Protox (flumioxazina e sulfentrazone) continuam sendo eficientes no manejo de biótipos resistentes. Na pós-emergência torna-se necessário o uso de cultivares geneticamente modificadas que possibilitem a aplicação de distintos mecanismos de ação. Neste sentido, as tecnologias LibertyLink<sup>®</sup> que permite o uso de amônio glufosinato, Enlist<sup>®</sup> que possibilita a aplicação de amônio glufosinato e 2,4-D e Intacta2

Xtend<sup>®</sup>, que permite o emprego de dicamba, podem se tornar importantes ferramentas para o manejo de *E. heterophylla* em um futuro próximo.

## **2.4 Conclusões**

O biótipo 32.2 apresenta resistência múltipla aos inibidores da HPPD e Protox e o biótipo 32.1 apresenta resistência múltipla a HPPD, Protox e ALS.

Os herbicidas pré-emergentes atrazina, flumioxazina e sulfentrazone são eficientes para o controle dos biótipos de leiteira, independente tipo de resistência acumulado.

Os herbicidas pós-emergentes atrazina, paraquat, paraquat+diuron, saflufenacil, glifosato, amônio glufosinato demonstraram controle satisfatório de todos os biótipos de leiteira.

### **3. Capítulo II – Investigação dos mecanismos associados a resistência de leiteira aos herbicidas inibidores da HPPD**

#### **3.1 Introdução**

As plantas daninhas representam uma grande ameaça à segurança alimentar a nível global. A competição com as culturas por água, luz e nutrientes acabam reduzindo o rendimento das culturas, e conseqüentemente a redução na oferta de alimentos. Os herbicidas sintéticos têm se tornado ferramentas valiosas para o controle de plantas daninhas na agricultura moderna, desde sua introdução na década 40, contribuindo imensamente para a produção de alimentos a nível global. Atualmente, 413 milhões de Kg de ingrediente ativo (i.a.) de herbicidas são pulverizados em áreas agrícolas no Brasil, o que representa 4,9 kg por hectare cultivado para cada ano agrícola, sendo que, do montante de agrotóxicos comercializados no país, 60,3% são representados por herbicidas (IBAMA, 2022). Porém, o uso generalizado de herbicidas para controlar plantas daninhas, sem a rotação de métodos de controle, ou até mesmo mecanismos de ação herbicida, levou à seleção de biótipos resistentes a estes compostos químicos.

Biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas geralmente podem ser controlados quimicamente por meio do uso de herbicidas que possuem locais de ação alternativos. O problema potencial com esta abordagem é a seleção para resistência a múltiplos herbicidas e/ou mecanismos de ação (PATZOLDT et al., 2005). Além disso, o número de plantas daninhas resistentes a herbicidas vem aumentando rapidamente, enquanto o desenvolvimento de novos mecanismos de ação vem diminuindo desde a década de 90 (DUKE, 2012).

Atualmente 53 casos de resistência a plantas daninhas foram documentados no Brasil, sendo 17 casos envolvendo resistência múltipla a dois ou mais mecanismos de ação (HEAP, 2022). Dentre as espécies de plantas daninhas que acumulam

resistência múltipla, biótipos de leiteira estão envolvidos em casos de resistência com inibidores da acetolactato sintase (ALS) (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL; MEROTTO JÚNIOR, 1999), da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (TREZZI et al., 2005) e da 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (MENDES et al., 2020a). Além disso, na América Latina, o Equador apresenta registro de biótipos com resistência a linuron, herbicida inibidor do fotossistema II (HEAP, 2022). Por outro lado, foi observado que biótipos de leiteira oriundos de diferentes regiões do RS apresentaram resposta diferenciada a aplicação de tembotrione, herbicida inibidor da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), e os ensaios de curva dose-resposta sugeriram a existência de biótipos resistentes (SILVA et al., 2016), porém o(s) mecanismo(s) que conferem a resistência, permanecem a serem elucidados.

A leiteira se adapta muito bem aos ambientes de produção agrícola do Brasil, preferindo solos bem drenados, mas se estabelecendo independente do sistema de cultivo do solo (direto ou convencional). As sementes podem germinar em uma ampla faixa de temperatura e características do solo, como pH e umidade. Além disso, as plântulas podem emergir de sementes enterradas até 14 cm de profundidade da superfície do solo (BRECKE, 1995), e as plantas adultas apresentam elevado índice de área foliar, proporcionando alta capacidade de competição como culturas eudicotiledôneas, como soja, algodão e amendoim (ADELUSI et al., 2006; BRIDGES et al., 1992). A interferência de leiteira pode diminuir a produtividade da soja em até  $5,1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$  sob competição simultânea (MESCHEDE et al., 2002). Enquanto para feijão houve redução de 60% no rendimento quando mais de 60 plantas  $\text{m}^{-2}$  estavam presentes (MACHADO et al., 2015).

Os mecanismos de resistência podem ser classificados como relacionados ao local de ação (RELA) e não relacionados ao local de ação (N-RELA). Mecanismos RELA geralmente envolvem mutações no gene que codifica a enzima alvo dos herbicidas, afetando a ligação do herbicida, seja próximo aos domínios catalíticos ou em regiões que afetam o seu acesso (GAINES et al., 2020). A maioria dessas mutações decorrem de polimorfismo de nucleotídeo único, mas polimorfismos envolvendo mais de um códon ou deleções completas de códons também foram documentadas (GHANIZADEH et al., 2019). Por outro lado, o aumento na quantidade de enzima alvo, seja pelo incremento da expressão gênica ou por duplicação gênica, são um importante, embora menos comum, mecanismo RELA (GAINES et al., 2020).

Os mecanismos N-RELA incluem o aumento do metabolismo do herbicida, sequestro do herbicida, redução da absorção e/ou translocação, bem como, o aumento da proteção contra oxidantes fortes (POWLES; YU, 2010; DÉLYE, 2013). Os mecanismos que podem contribuir para a resistência N-RELA são complexos e frequentemente envolvem genes que são membros de grandes famílias. Por exemplo, as enzimas envolvidas nas resistências baseadas no metabolismo de herbicidas incluem citocromos P450, GSH S-transferases, glicosil transferase e outras transferases (GAINES et al., 2020).

O entendimento dos mecanismos de resistência permite entender a dinâmica evolutiva das populações de plantas daninhas para sobreviver a determinado herbicida. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos de resistência aos inibidores da HPPD em duas populações de leiteira oriundas da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

### **3.2 Material e Métodos**

Para a realização dos estudos, foram utilizadas sementes dos biótipos resistentes aos inibidores da HPPD (32.1 e 32.2) e do suscetível 10.1. Os ensaios para investigar os mecanismos de resistência foram realizados em casa de vegetação, laboratório de biologia molecular e de dinâmica de herbicidas do CEHERB/UFPEL, sendo a metodologia empregada em cada estudo, detalhada a seguir.

#### **3.2.1 Absorção, translocação e metabolismo de tembotrione**

Os biótipos de leiteira foram cultivados, em casa-de-vegetação do CEHERB/UFPEL, em vasos de 700 mL preenchidos com solo e substrato na proporção de 3:1, conforme descrito no ensaio de curva dose-resposta do capítulo I. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x6, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por uma planta. O fator A foi composto pelos biótipos 10.1 (suscetível), 32.1 e 32.2 (resistentes), enquanto o fator B foi composto pelos tempos de coleta (0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) após a aplicação de tembotrione.

Para realizar a aplicação do herbicida, a solução de tratamento foi preparada em água destilada, adicionando 1,008 g L<sup>-1</sup> de tembotrione (Soberan<sup>®</sup> 420 SC), acrescido de óleo metilado de soja na proporção de 0,5% v/v, a fim melhorar a superfície de contato da gota com a folha (GODAR et al., 2015). As plantas de leiteira

foram tratadas quando atingiram 4 folhas completamente expandidas, assim cada planta foi tratada com 10 microgotas de 2 µl da solução herbicida na superfície adaxial da 3ª folha expandida, fornecendo precisamente 20,16 µg de tembotrione por planta.

Os tecidos vegetais foram amostrados logo após a secagem das gotículas para comparações de recuperação (0 h) e posteriormente às 12, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento. Os resíduos do herbicida não absorvidos na folha tratada foram recuperados com 5 ml de solução contendo 80% de acetonitrila e 20% de água destilada. Uma alíquota de 1 ml foi amostrada a partir da solução de lavagem foliar, para quantificação de tembotrione por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (UHPLC-MS/MS).

Para cada período de coleta, os tecidos vegetais foram separados em três partes: folha tratada, folhas acima da tratada e folhas abaixo da tratada, sendo destacados da planta, pesados e armazenados a -80 °C até o momento da extração. Para realizar a extração, foi utilizada metodologia proposta por Su et al. (2020) com modificações. As amostras de tecido vegetal foram maceradas em nitrogênio líquido, inseridas em tubos de polipropileno de 15 mL, sendo adicionado ao tubo 2,5 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético a 5% e 1 mL de água deionizada, seguido de agitação em vórtex por 1 min. NaCl (200 mg) e MgSO<sub>4</sub> anidro (800 mg) foram adicionados com a finalidade de homogeneizar a amostra para separação de fases. O conteúdo do extrato foi agitado em vortex por 30 s e em seguida, centrifugado a 20°C, por 3,0 min a 5000 rpm.

A fase superior de acetonitrila (1,5 mL) foi transferida para tubo de 2,0 mL, no qual foi purificado com 50 mg de amina primária e secundária (PSA), 5 mg de carvão grafitizado (GCB) e 150 mg de MgSO<sub>4</sub> anidro. O conteúdo foi agitado em vórtex por 1,0 min e centrifugado por 3,0 min a 10.000 rpm a 20°C. O sobrenadante foi filtrado para vials de cromatografia por meio de filtro de seringa de de nylon (0,22 µm) e, em seguida, 10 µL de amostras foram analisadas via UHPLC-MS/MS para quantificação de tembotrione e identificação dos metabólitos conhecidos conforme detalhado por Küpper et al. (2018).

O UHPLC-MS/MS utilizado, foi o modelo *Q-Exactive Focus*, contendo amostrador automático *Dionex ultimate 3000*, acoplado a espectrômetro de massas *Q-Orbitrap*, com sistema de aquisição de dados pelo software *Trace Finder* (*Thermo Scientific*, EUA). A separação cromatográfica foi realizada em coluna analítica *Accucore C18*, 2,6 µm - 100x2.1 mm (*Thermo Scientific*, EUA), mantida na

temperatura de 40°C. Para a eluição do tembotrione e demais metabólitos analisados, utilizou-se as fases móveis, A) água ultrapura, 0,1% de ácido fórmico (v/v) e B) acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição iniciou em 5% B até 0.5 min, aumentando para 95% B até 4 min, mantendo-se em modo isocrático por mais 0.5 min, reduzindo para 5% B aos 5 min e finalizando em 5% B aos 6 min, com fluxo de 0,300 mL min<sup>-1</sup>.

As condições de espectrometria de massas foram: fonte de ionização: eletrospray; modo de eletrospray: positivo e negativo; energia de ionização: 20, 40 e 60 eV; temperatura do capilar: 340 °C; voltagem do *spray*: 4.0 kV; vazão do *sheat* gás: 40 L h<sup>-1</sup>; vazão do gás auxiliar: 12 L h<sup>-1</sup> e resolução: 70.000. O tempo de retenção dos analitos e os íons monitorados (precursor e produto) podem ser encontrados na tabela 8, enquanto a fórmula estrutural de tembotrione e seus metabólitos podem ser observados na figura 13. A curva-padrão de tembotrione foi preparada em acetonitrila, nas concentrações de 1.0 até 250.0 µg L<sup>-1</sup>. O padrão analítico de tembotrione utilizados foi obtido pela *Sigma-Aldrich*®.

Tabela 8- Nome do composto, fórmula molecular, massa molecular, tempo de retenção, íon precursor e produtos monitorados para tembotrione e seus metabólitos. Capão do Leão, RS, 2022.

Nome do composto	Fórmula molecular	Massa molecular	T.R.*	Íon precursor	Produtos
Tembotrione	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> ClF <sub>3</sub> S	440.0302	4.97	441.0381	341.0243
				[M+H] <sup>+</sup> ;	305.0475
				458.0646	262.0389
M1	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub> ClF <sub>3</sub> S	660.0891	-	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-
				659.0818	-
M2	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ClF <sub>3</sub> S	345.9889	3.87	[M-H] <sup>-</sup>	-
				344.9817	-
M3/M4	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> ClF <sub>3</sub> S	456.0257	4.63	457.0330	-
				[M+H] <sup>+</sup> ;	-
				474.0595	-
M5	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ClF <sub>3</sub> S	438.0152	5.02	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-
				437.0079	-
M6	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ClF <sub>3</sub> S	357.9889	-	[M-H] <sup>-</sup>	-
				356.9817	-
M7	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> ClF <sub>3</sub> S	618.0785	3.95	[M-H] <sup>-</sup>	-
				617.0712	-
M8	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> ClF <sub>3</sub> S	616.0629	-	[M-H] <sup>-</sup>	-
				615.0556	-
M9	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> ClF <sub>3</sub> S	472.0206	3.82	471.0133	-
				[M-H] <sup>-</sup>	-

\* Tempo de retenção

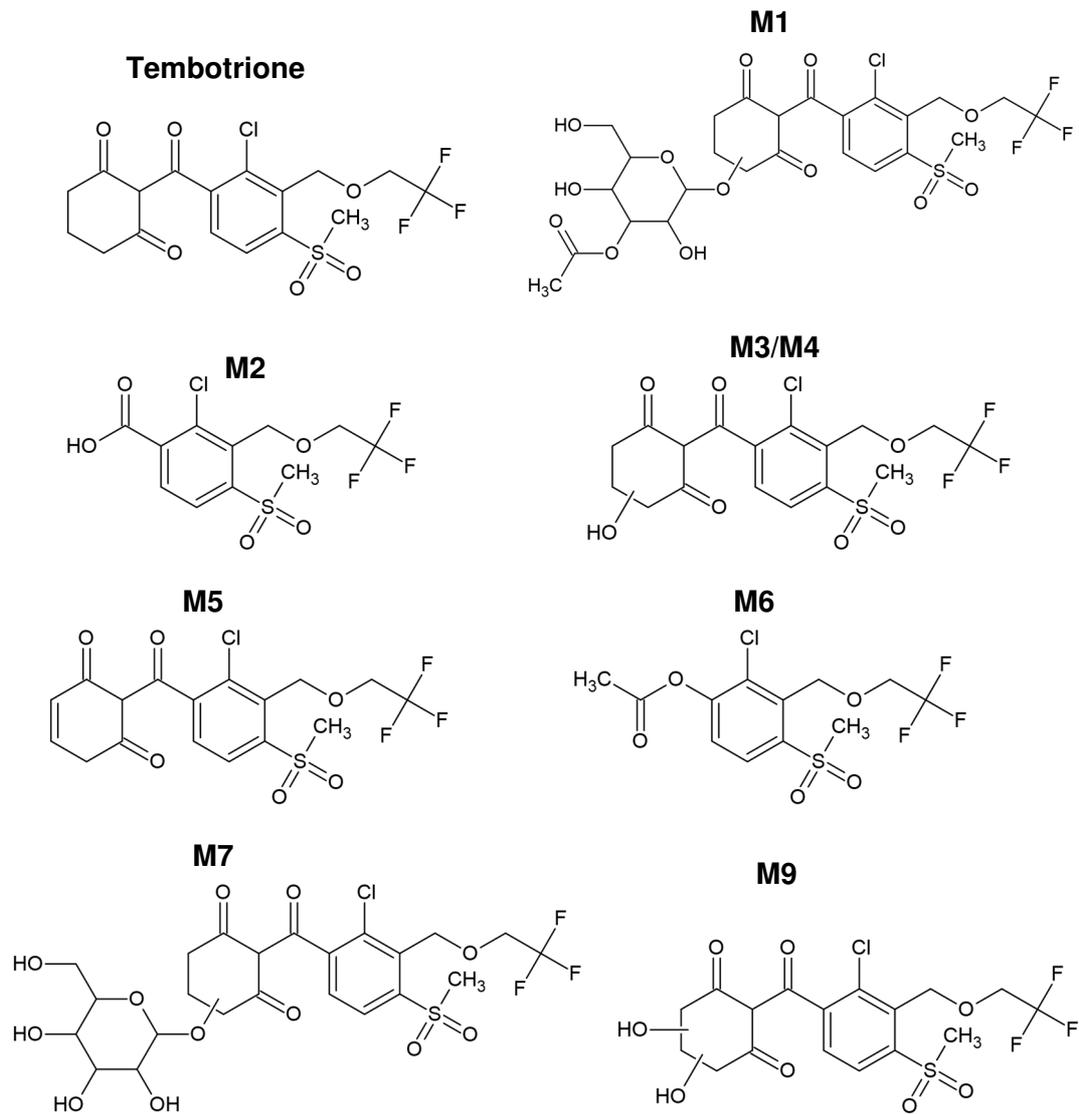


Figura 13- Fórmula estrutural de tembotrione e seus principais metabólitos monitorados nos biótipos de leiteira as 48h após a aplicação de tembotrione. \* M8 não foi desenhado pois é a forma reduzida de M7 e se desconhece o local exato onde está localizada a dupla ligação resultante da perda de dois átomos de hidrogênio. Capão do Leão, RS, 2022.

A absorção foi definida como o total recuperado em cada lavagem, expresso percentualmente ao total recuperado na lavagem realizada no tempo 0. As quantidades relativas de tembotrione nas três seções das plantas (folha tratada, folhas acima da tratada e abaixo da tratada) foram expressos em  $\mu\text{g}$  de tembotrione por  $\text{g}^{-1}$  de tecido vegetal. Os metabólitos de tembotrione foram avaliados na folha tratada as 48 horas após a aplicação de tembotrione e demonstrados graficamente através de cromatogramas de abundância relativa. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homocedasticidade pelo teste de Hartley

e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em caso de significância, foram comparados os fatores tempo de coleta e biótipos de leiteira através de regressões.

### **3.2.2 Efeito de inibidores da P450 no metabolismo de tembotrione**

Os biótipos de leiteira foram cultivados em casa-de-vegetação, nas mesmas condições descritas acima no item 3.2.1. O experimento foi arranjado em esquema fatorial  $3 \times 3 \times 9$ , com quatro repetições. O fator A representou os biótipos resistentes e suscetível; o fator B, a ausência e os inibidores da P 450: malation e butóxido de piperonila (PBO); já o fator C, as doses de tembotrione (0; 12,6; 25,2; 50,4; 100,8; 201,6; 403,2; 806,4 e 1612,8 g ha<sup>-1</sup>), acrescidas de óleo metilado de soja na proporção de 0,5% v/v à calda de pulverização.

Quando as plantas apresentaram 3-4 folhas, foi aplicado os inibidores da P450, malathion (Malathion 1000 EC) e PBO (K-Obiol 25 EC), ambos na dose de 2000 g ha<sup>-1</sup>, duas horas antes da pulverização das doses do herbicida tembotrione. Para garantir a inibição das enzimas P450, e limitar a possível metabolização de tembotrione, foi adicionado ao solo, 50 ml de solução contendo 5 mM de malathion e PBO, para seus respectivos tratamentos, as 48 horas após a aplicação das doses do herbicida. As pulverizações foram realizadas com equipamento costal pressurizado com CO<sub>2</sub>, seguindo as mesmas condições descritas no capítulo I.

As variáveis avaliadas foram controle (30 DAT) e redução da massa seca, conforme detalhado no capítulo I. Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e homocedasticidade (teste de Hartley), e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ), caso constatada diferença significativa foram submetidos à análise de regressão ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.2.3 Expressão do gene HPPD**

Para realização do experimento de expressão da *HPPD* os biótipos resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) foram tratados com tembotrione na dose de 100,8 g ha<sup>-1</sup> e óleo metilado de soja na concentração de 0,5% v/v, com equipamento costal pressurizado com CO<sub>2</sub>, conforme as condições estabelecidas no capítulo I. A 3ª e 4ª folha das plantas de leiteira foram coletadas as 0, 12, 24 e 48 horas após a aplicação

do herbicida, sendo congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para isolamento de RNA.

O tecido congelado, em três repetições biológicas independentes, foi macerado em nitrogênio líquido usando almofariz e pistilo pré-resfriados para evitar o descongelamento, sendo transferido 100 mg de tecido para tubos de 1,5 mL. A extração do RNA total foi realizada usando PureLink™ (Plant RNA Reagent-Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA passaram por um processo de limpeza e foram acondicionadas overnight em suspensão com LiCl 10 M em volume correspondente a ¼ do volume total da amostra. Após este período, a integridade do RNA total foi verificada em eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando GelRed (Invitrogen™). A qualidade e concentração do RNA foi aferida em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). 1 µg de RNA de cada amostra foi tratado com DNase I (Invitrogen™) e convertido em cDNA utilizando Oligo(dT) e o SuperScript™ III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante.

Os cDNAs sintetizados foram utilizados para PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para quantificar a expressão da *HPPD* seguindo as recomendações do guia MIQE para experimentos em qPCR (BUSTIN et al., 2009). Para as análises em RT-qPCR, foram utilizados oligonucleotídeos para o gene alvo (*HPPD*) e para os genes de referência (*β-tubulin* e *18S rRNA*) (Tabela 9). Os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para a leiteira foram desenhados no software Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) utilizando a sequência parcial da CDS (*coding sequence*) da *HPPD* de *Euphorbia heterophylla* disponível na plataforma *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds* (HEAP, 2022). A eficiência de amplificação e especificidade de cada oligonucleotídeo foram determinadas em experimentos de validação utilizando quatro diluições seriadas de cDNA. Foram utilizados nos ensaios de quantificação da expressão gênica oligonucleotídeos apresentando eficiência entre 90 e 110% e um único pico na curva de dissociação.

Os experimentos de expressão gênica foram realizados no termociclador LightCycler™ 480 Instrument II (Roche™, Rotkreuz, Switzerland) com três repetições biológicas e três repetições técnicas. As reações foram realizadas em placas LightCycler™ 480 Multiwell Plates 96 (Roche™, Rotkreuz, Switzerland) contendo cDNA (1,0 µL) na diluição de 1:25 (diluição determinada no experimento de validação),

PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) (5,0  $\mu$ L), oligonucleotídeo forward 500 mM (0,5  $\mu$ L) e UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™) (3,0  $\mu$ L) em uma reação de 10,0  $\mu$ L de volume total.

Tabela 9- Oligonucleotídeos para o gene alvo e para os genes de referência utilizados para os estudos de expressão gênica em RT-qPCR. Capão do Leão, RS, 2022.

Gene	Oligonucleotídeo forward (5'-3')	Oligonucleotídeo reverse (5'-3')	Referência
Alvo	<i>HPPD</i> GTGTTTGGGACGAAGAGG AA	AAGCGCCAAATGCTGTACT C	Heap, 2022
Referência	$\beta$ - <i>tubulin</i> ATGTGGGATGCCAAGAACA TGATGTG	TCCACTCCACAAAGTAGGA AGAGTTCT	Nakka et al., 2017
Referência	<i>18S rRNA</i> CTACGTCCCTGCCCTTTGT ACA	ACACTTCACCGGACCATTC AA	Jain et al., 2006

As reações de RT-qPCR foram realizadas nas seguintes condições, de acordo com as recomendações do fabricante para uso do PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems): UGD Activation a 50 °C por 2 minutos, Dual Lock DNA polimerase a 95 °C por 2 minutos, e 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e extensão e anelamento a 60 °C (temperatura determinada no experimento de validação) por 1 minuto. A curva de *melting* foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 5 segundos, 70 °C por 1 minuto e uma rampa de temperatura até 95 °C aumentando 0,5 °C por 5 segundos.

A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo os dados correspondentes aos tratamentos 12, 24 e 48 horas após a aplicação de tembotrione, comparados a condição controle (0 horas de aplicação de tembotrione) para cada biótipo e normalizados utilizando os genes de referência  $\beta$ -*tubulin* e *18S rRNA*.

### 3.3 Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados seguindo a ordem exposta no material e métodos.

#### 3.3.1 Absorção, translocação e metabolismo de tembotrione

Os valores observados para absorção demonstraram interação entre biótipos e horas após a aplicação de tembotrione, onde os dados se ajustaram ao modelo sigmoidal logístico de três parâmetros (Figura 14). Foi verificado que os biótipos resistentes (32.1 e 32.2) apresentam absorção levemente superior ao biótipo

suscetível (10.1) nas primeiras 24 horas após a aplicação de tembotrione. Esses resultados podem ter ocorrido em virtude que nos horários iniciais de exposição os biótipos resistentes apresentam menor gradiente de concentração entre a cutícula e células do mesófilo em comparação ao suscetível. Assim, maior quantidade de herbicida pode estar difundindo em direção ao menor gradiente de concentração (epiderme, parênquima paliçádico e lacunoso), da área de maior concentração (cutícula).

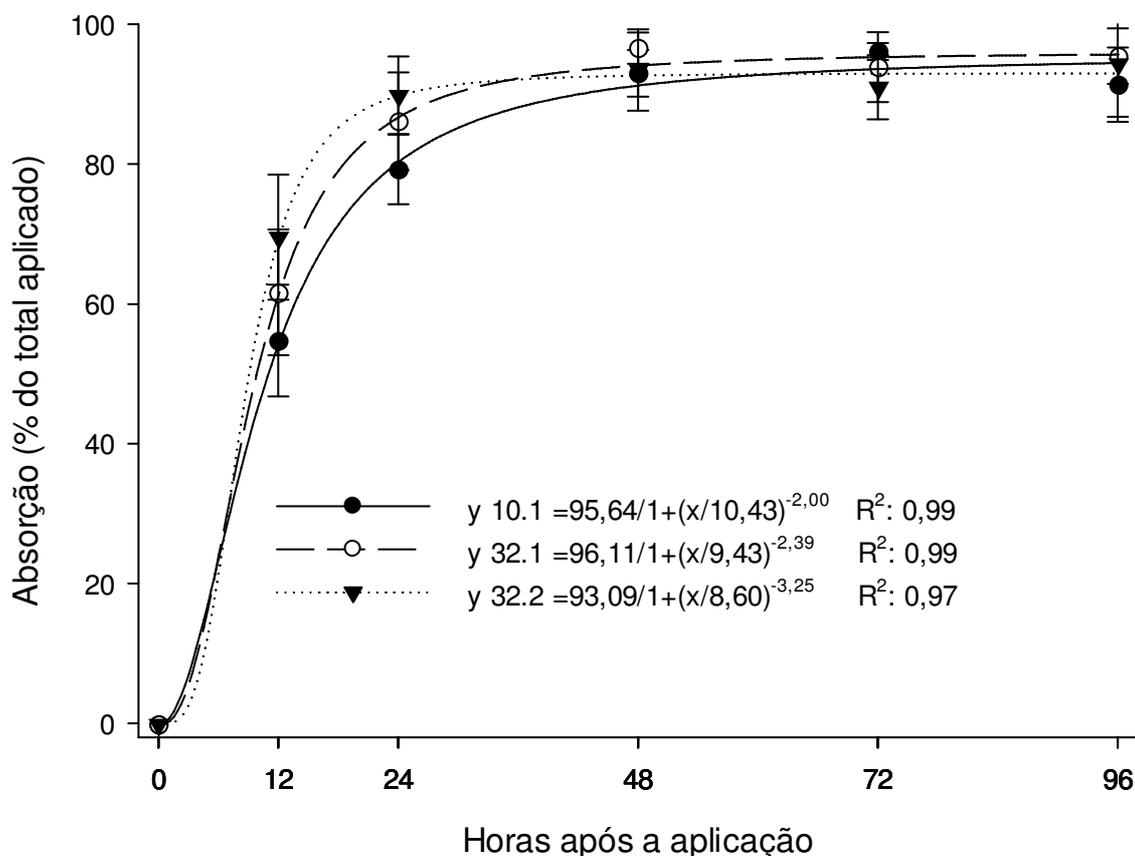


Figura 14- Absorção de tembotrione (%) pelos biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.

Com o passar do período de exposição ao herbicida tembotrione o gradiente de concentração passou a ter pouca influência na absorção do herbicida entre os biótipos de leiteira. A partir das 48 horas após a aplicação de tembotrione, não foi observado diferença entre os biótipos, sendo que, cerca de 95 % do total aplicado de tembotrione foi absorvido pela cutícula das plantas tratadas. O grupo químico das tricetonas, nos quais incluem os herbicidas tembotrione, mesotrione e sulcotrione

apresentam rápida absorção pela cutícula das plantas, onde valores superiores a 75% são observados nas primeiras 12 horas após a exposição a esta classe de herbicidas (GODAR et al., 2015; KÜPPER et al., 2018; LU et al., 2020).

As características físico-químicas de tembotrione as quais incluem, baixa pressão de vapor, log de Kow próximo a 2 em soluções com pH ácido ( $\leq 2.0$ ) e solubilidade em água de  $28 \text{ g L}^{-1}$ , permitem que o herbicida seja rapidamente absorvido pela cutícula foliar, onde valores acima de 90% foram observados em plantas de *A. palmeri* as 24 horas após a aplicação do herbicida (CHEMBASE, 2022; KÜPPER et al., 2018). Baseado nos resultados é evidente que a absorção de tembotrione é semelhante entre os biótipos resistentes e suscetível, portanto, a absorção diferencial não é responsável pela resistência aos herbicidas inibidores de HPPD.

Os dados da quantificação de tembotrione na folha tratada se ajustaram ao modelo exponencial decrescente de três parâmetros (Figura 15). As 12 horas após a aplicação de tembotrione, pode ser observado que os biótipos resistentes apresentavam menor quantidade de tembotrione na folha tratada, cerca de 40 e 33%, respectivamente, para os biótipos 32.1 e 32.2 em comparação ao biótipo 10.1. Com o decorrer dos períodos de avaliação a diferença na concentração de tembotrione entre os biótipos resistentes e o suscetível incrementou, sendo que nas 24h a diferença foi próxima a 10x, nas 48 h a 8 x, nas 72h a 20x e nas 96 a 7x.

Os resultados da quantificação de tembotrione na folha tratada demonstra que o herbicida é absorvido pelos biótipos resistentes, sendo observado as 12 horas após a aplicação valores próximos a  $50 \mu\text{g g}^{-1}$ , no entanto, como os valores verificados após as 12 horas foram altamente inferiores, pode-se inferir que o herbicida ou é rapidamente dissipado da folha tratada para outras partes da planta, ou metabolizado em outros compostos. Para avaliar se o herbicida é rapidamente dissipado para outras partes da planta, tembotrione foi quantificado nas folhas acima e abaixo da tratada.

Os dados da quantificação de tembotrione nas folhas acima e abaixo da tratada se ajustaram ao modelo polinomial linear, para os biótipos resistentes (32.1 e 32.2), enquanto o biótipo suscetível (10.1) não apresentou ajuste ao modelo proposto (Figuras 16 e 17). Os resultados demonstraram que nos biótipos resistentes, a concentração de tembotrione nas folhas acima da tratada foram inferiores nos biótipos 32.1 e 32.2, em comparação ao biótipo 10.1 (Figura 16). Nos biótipos resistentes, a concentração de tembotrione foi próxima a  $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$  as 12h após a aplicação, sendo

que esses valores seguiram a tendência de redução com o decorrer dos horários de avaliação, onde a concentração encontrada nas 96 horas após a aplicação do herbicida próxima a  $0 \mu\text{g g}^{-1}$ .

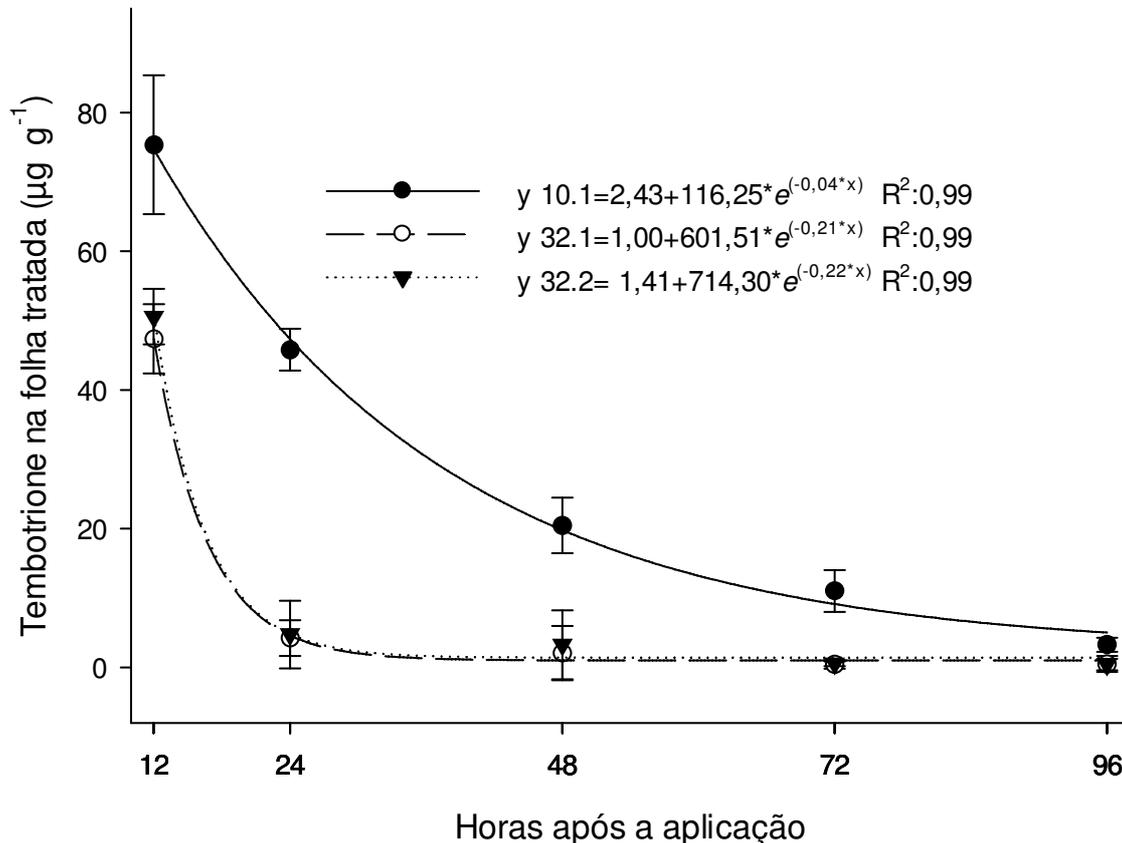


Figura 15- Tembotrione  $\mu\text{g por g}^{-1}$  de tecido vegetal da folha tratada dos biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.

No biótipo suscetível a concentração de tembotrione incrementou até as 48 horas, chegando ao máximo de  $7,1 \mu\text{g g}^{-1}$ , sendo que nos horários seguintes, a concentração reduziu para valores próximos a  $3,5 \mu\text{g g}^{-1}$ . O biótipo suscetível mantém concentração de tembotrione nas folhas acima da folha tratada (folha não expandida e folhas meristemáticas) com valores acima de  $3,5 \mu\text{g g}^{-1}$  após 24h da aplicação do herbicida, enquanto nos resistentes em todos os períodos avaliados a quantidade foi sempre inferior a  $0,62 \mu\text{g g}^{-1}$ .

O acúmulo de tembotrione nas folhas abaixo da tratada foi altamente inferior nos biótipos resistentes em comparação ao suscetível (Figura 17). O biótipo suscetível apresentou valores próximos a  $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$  durante as 24 e 48 horas após a aplicação

de tembotrione, enquanto os resistentes apresentaram 15 vezes menos herbicida, com a concentração próxima a  $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ . Com o decorrer dos períodos de avaliação, houve redução na concentração do biótipo suscetível, no entanto, os valores observados foram de  $0,42$  e  $0,13 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente para as 72 e 96 horas após a aplicação de tembotrione, enquanto para os biótipos resistentes os valores observados foram inferiores ao limite de detecção.

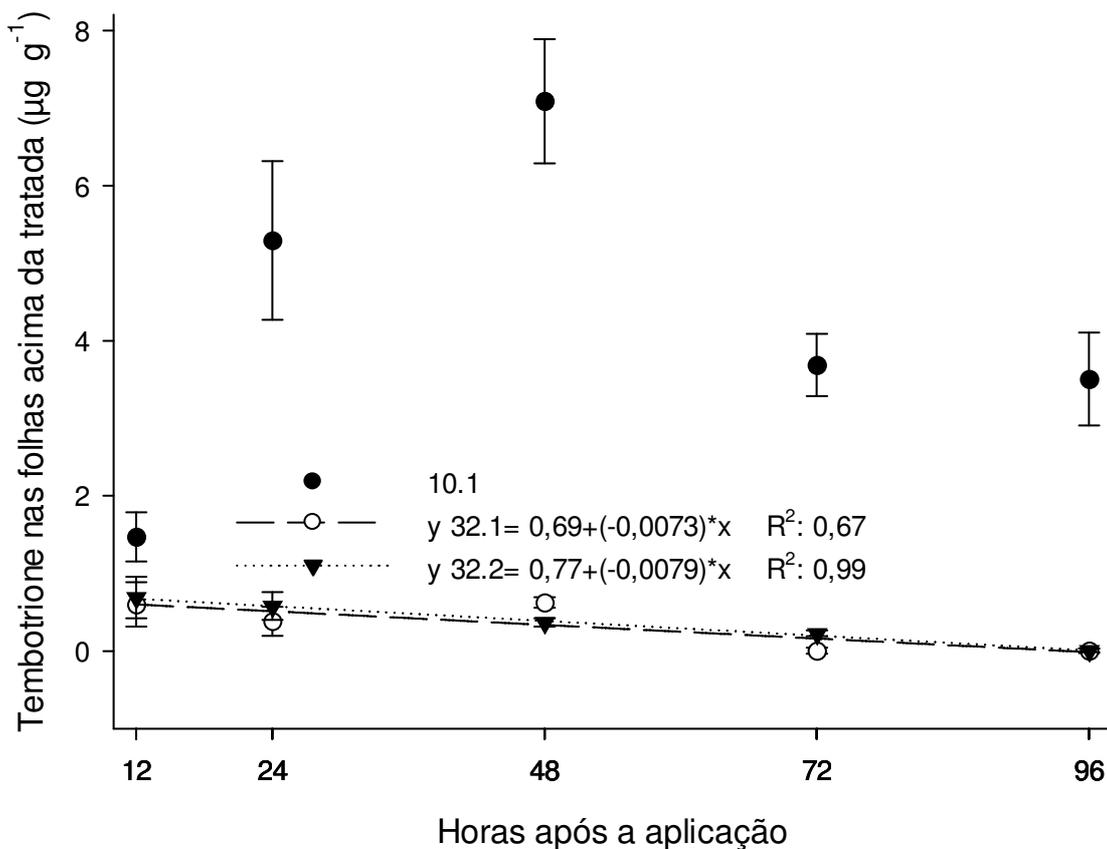


Figura 16- Tembotrione  $\mu\text{g g}^{-1}$  nas folhas acima da tratada nos biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.

As folhas abaixo da tratada nos biótipos resistentes e suscetível, demonstraram comportamento similar as acima da folha tratada, em relação ao acúmulo de tembotrione com o decorrer dos períodos de avaliação (Figura 16 e 17). Porém, o montante verificado por  $\text{g}^{-1}$  de tecido vegetal, foi inferior nas folhas abaixo da tratada, em comparação as acima da tratada. O tembotrione é móvel tanto no simplasto da planta (floema) quanto no apoplasto (xilema) (VAN ALMSICK et al., 2009). A mobilidade no floema é de particular importância, pois garante que após a

pulverização em pós-emergência o herbicida seja distribuído no fluxo de fotoassimilados das folhas maduras (fontes metabólicas) para as folhas em desenvolvimento altamente suscetíveis (drenos metabólicos) no ápice da parte aérea (DAN et al., 2018). Ensaio utilizando tembotrione marcado com  $^{14}\text{C}$  aplicado em folha fotossinteticamente ativa, demonstram maior radioatividade concentrada no ápice das plantas (KÜPPER et al., 2018), indicando fluxo e acúmulo preferencial do herbicida no meristema apical.

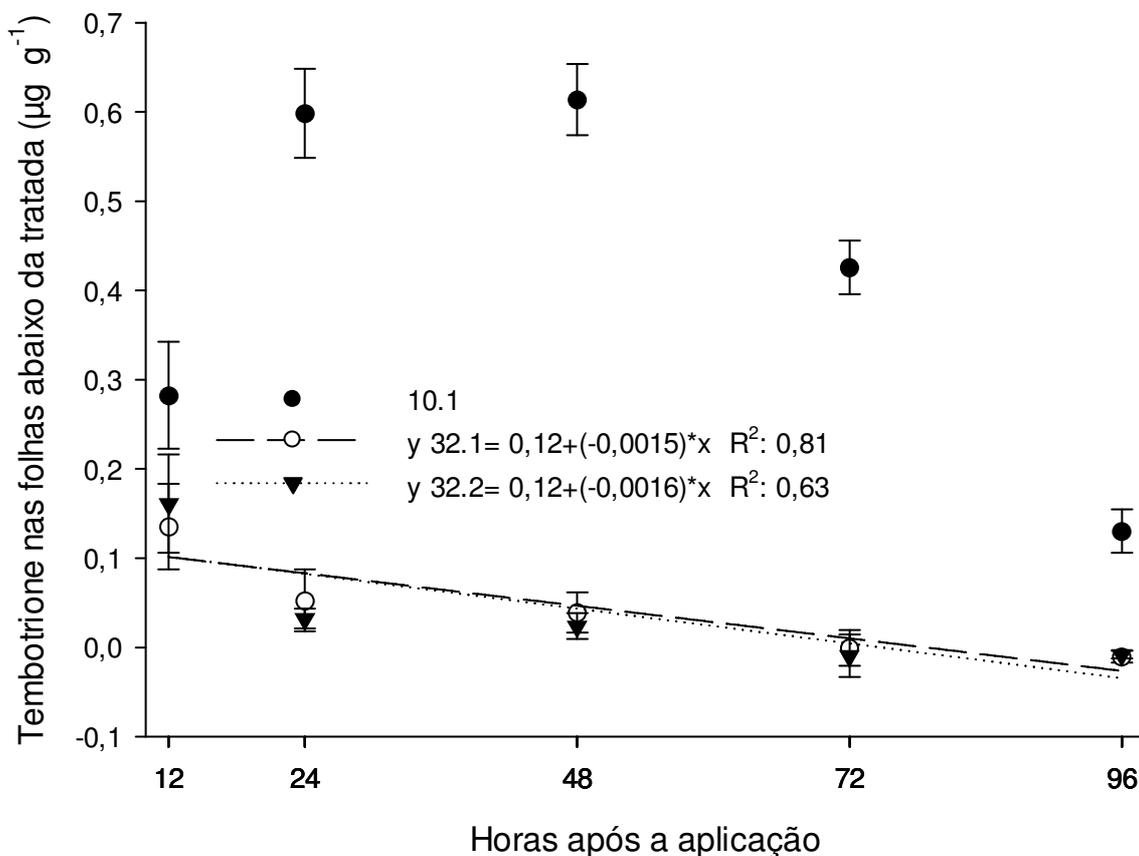


Figura 17- Tembotrione  $\mu\text{g por g}^{-1}$  nas folhas abaixo da tratada nos biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) em diferentes horários após a aplicação do herbicida. Capão do Leão, RS, 2022.

Os biótipos resistentes apresentaram menor acúmulo de tembotrione em todas as partes avaliadas (folha tratada, folhas acima e abaixo da tratada), desta forma, para avaliar a possível metabolização de tembotrione em outros compostos, o íon precursor de metabólitos conhecidos de tembotrione (Tabela 8) foram monitorados via UHPLC-MS/MS (Figura 13), nas amostras correspondentes as 48 horas após a aplicação de tembotrione. Os cromatogramas de abundância relativa de tembotrione

e seus metabólitos podem ser observados na folha tratada (Figura 18), nas folhas acima da tratada (Figura 19) e nas abaixo da tratada (Figura 20), para os biótipos suscetível 10.1 (A) e resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C). Dos metabólitos conhecidos de tembotrione monitorados, foram identificados nos biótipos de leiteira tratados com tembotrione os metabólitos M2, M3/M4 e M5 (Figuras 18, 19 e 20).

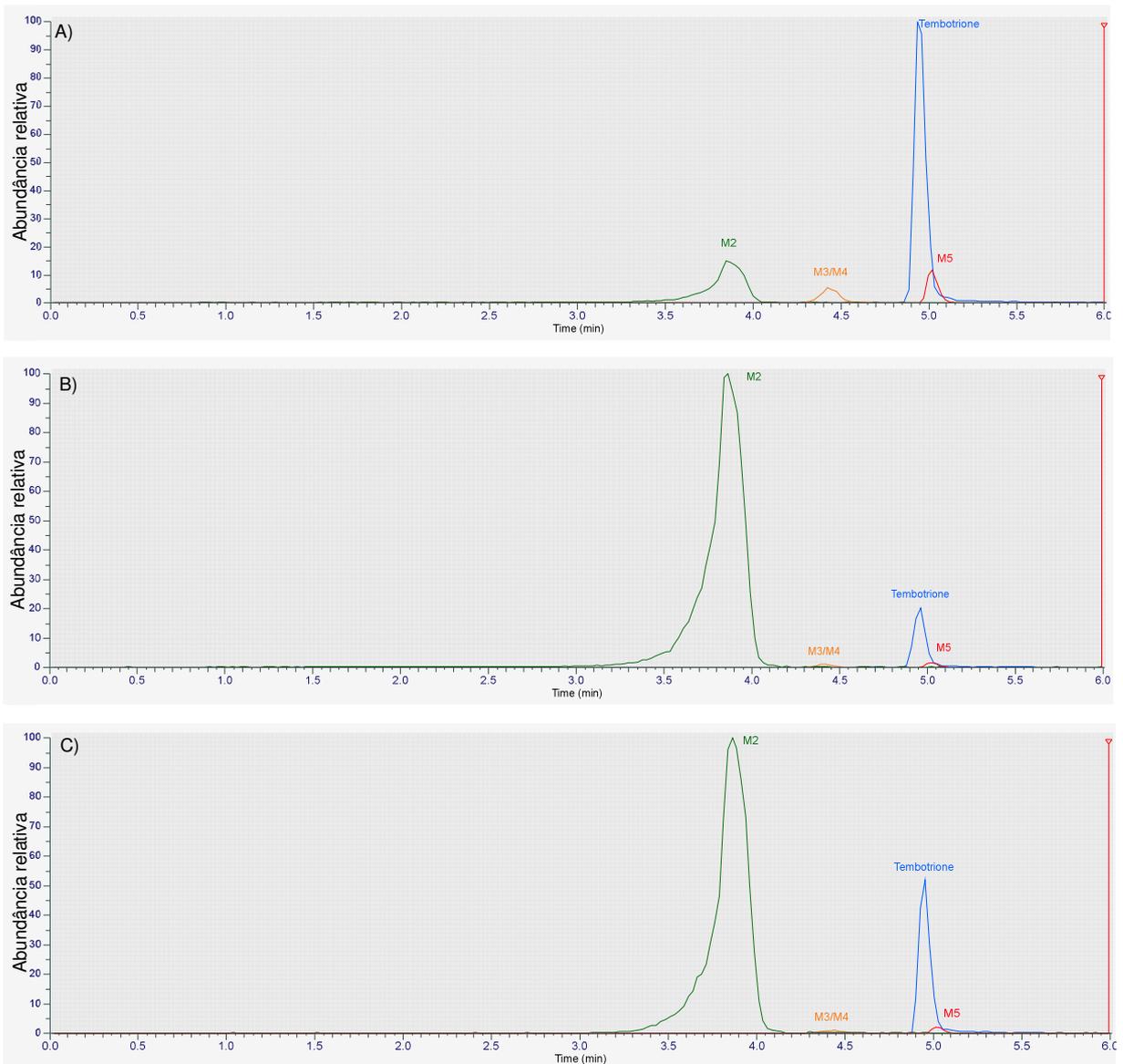


Figura 18- Cromatogramas de UHPLC mostrando tembotrione e os principais metabólitos observados nos biótipos de leiteira suscetível 10.1 (A) e resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C), avaliados as 48 horas após o tratamento na folha tratada. Capão do Leão, RS, 2022.

Na folha tratada, as 48 horas após a aplicação de tembotrione foi observado no biótipo suscetível maior abundância relativa de tembotrione em detrimento dos metabólitos, sendo os valores observados destes compostos, inferiores a 15% (Figura

18A). Por outro lado, os biótipos resistentes apresentaram elevado acúmulo do metabólito M2 e baixa abundância relativa dos metabólitos M3/M4 e M5, porém a quantidade relativa de tembotrione foi reduzida significativamente, onde os valores observados foram próximos a 20% no biótipo 32.1 e 53% no biótipo 32.2, quando comparados ao metabólito M2 (Figura 18B e 18C).

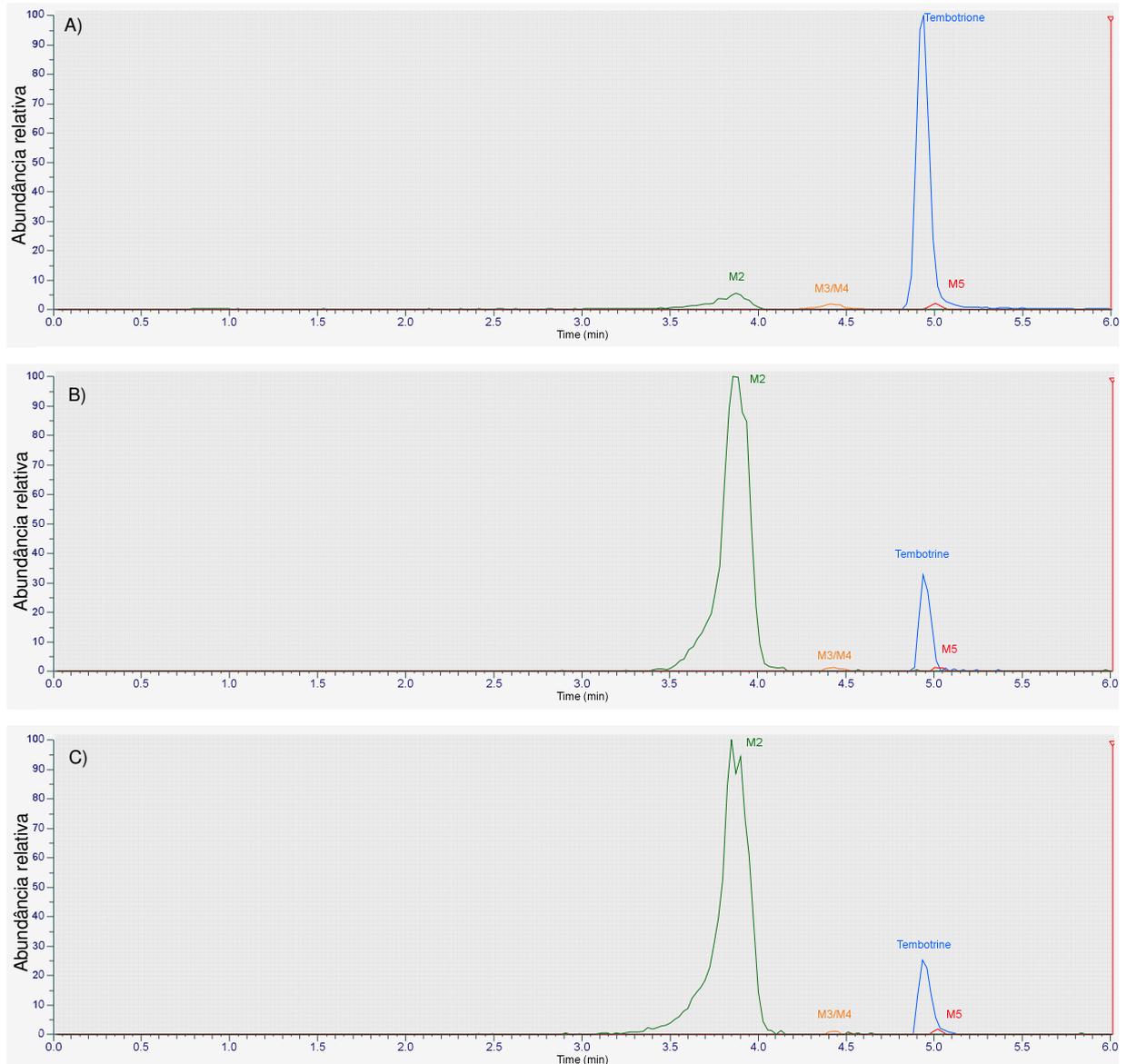


Figura 19- Cromatogramas de UHPLC mostrando tembotrione e os principais metabólitos observados nos biótipos de leiteira suscetível 10.1 (A) e resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C), avaliados as 48 horas após o tratamento nas folhas acima da tratada. Capão do Leão, RS, 2022.

Os resultados de abundância relativa de tembotrione nas folhas acima da tratada e abaixo da tratada, demonstraram resultados similares ao observado na folha tratada (Figuras 19 e 20). De maneira geral, o biótipo suscetível apresenta baixa

abundância relativa dos metabólitos de tembotrione e mantém intensidades elevadas de tembotrione. Os biótipos resistentes apresentam baixa abundância relativa de tembotrione e dos metabólitos M2/M4 e M5, no entanto apresentam acúmulo de intensidades expressivas do metabólito M2.

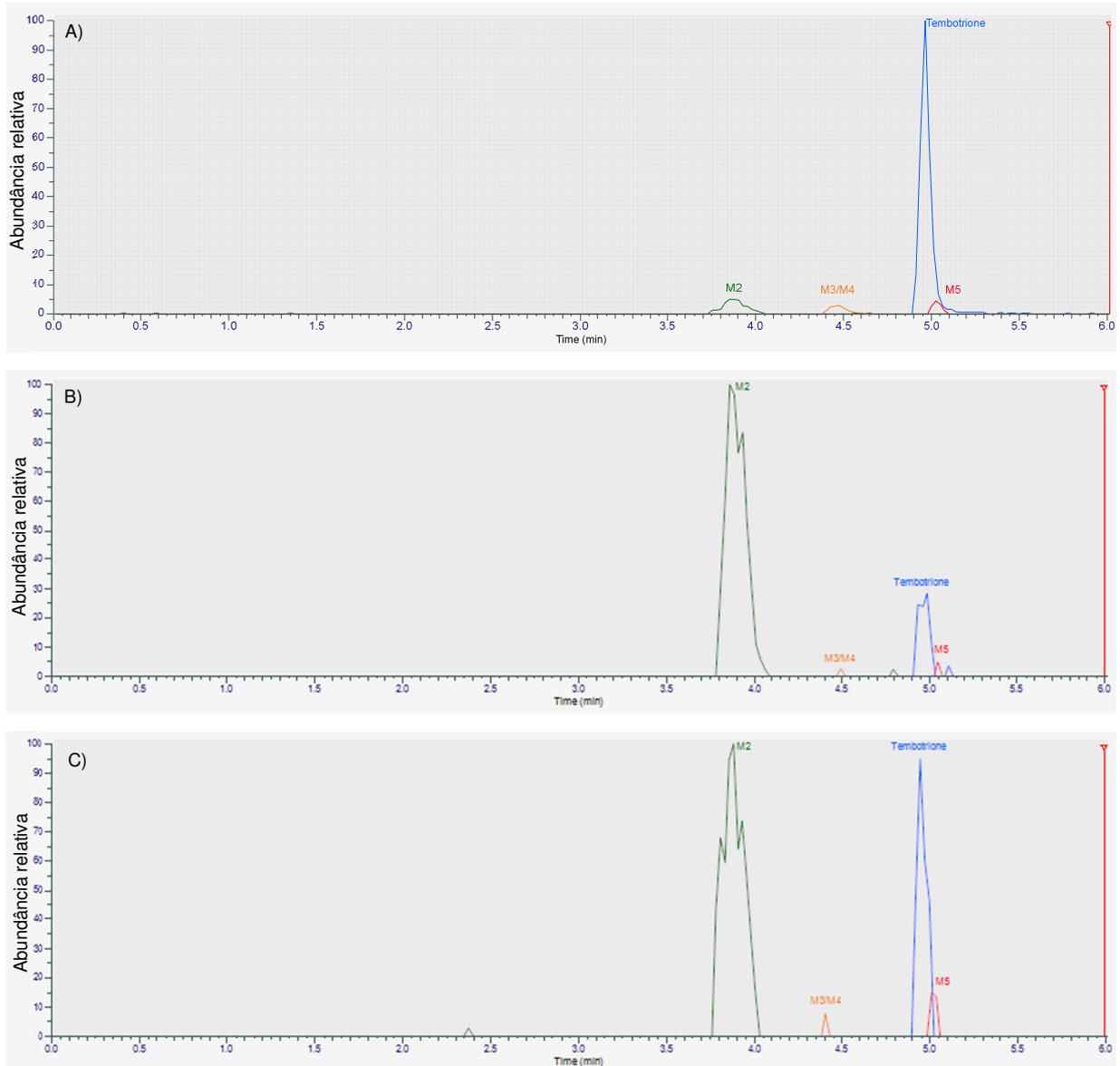


Figura 20- Cromatogramas de UHPLC mostrando tembotrione e os principais metabólitos observados nos biótipos de leiteira suscetível 10.1 (A) e resistentes 32.1 (B) e 32.2 (C), avaliados as 48 horas após o tratamento nas folhas abaixo da tratada. Capão do Leão, RS, 2022.

Esses resultados sugerem que a resistência de leiteira a tembotrione é conferida pela rápida metabolização do herbicida, através da clivagem da estrutura cicloexano e formação do metabólito M2. O M2 é resultante da clivagem oxidativa formada pela separação da 1,3-ciclohexanodiona (CHD) do anel benzoico de

tembotrione, sendo denominado de acordo com as regras estabelecidas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como {2-[2-cloro-4-metil-3-(2,2,2-trifluoro etoxi)metil] ácido benzoico} e identificado como TCMBA (CALVAYRAC et al., 2013; RANI et al., 2020) ou AE 0456148 (BRANCATO et al., 2018).

TCMBA é um metabólito da degradação de tembotrione no solo (RANI et al., 2020), via fotólise (CALVAYRAC et al., 2013) e no metabolismo vegetal (KÜPPER et al., 2018). Derivados do ácido benzoico também são encontrados como subprodutos da degradação de outros herbicidas do grupo químico das tricetonas, como o sulcotrione, que forma CMBA (HALLE et al., 2006; CHAABANE et al., 2008) e mesotrione que origina MNBA (ALFERNESS; WIEBE, 2002).

Os casos conhecidos envolvendo a resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da HPPD apresentam como mecanismo de resistência a rápida metabolização do herbicida (KÜPPER et al., 2018; KAUNDUN et al., 2017; LU et al., 2020), ou a metabolização associada ao aumento da expressão do gene HPPD (NAKKA et al., 2017). Nos casos envolvendo a rápida metabolização, o principal metabólito formado em plantas resistentes é o 4/5-hidroxitembotrione (M3/M4), para tembotrione (KÜPPER et al., 2018) e 4-hidroximesotrione (KAUNDUN et al., 2017; LU et al., 2020) para mesotrione, metabólitos esses, que são conhecidos por assegurarem a seletividade desses herbicidas no milho (LU et al., 2020). A oxidação das moléculas de tembotrione e mesotrione e formação, respectivamente, de 4/5-hidroxitembotrione e 4-hidroximesotrione, em plantas daninhas resistentes é mediada por enzimas do complexo P450, porém os genes que conferem resistência metabólica a herbicidas inibidores de HPPD não foram identificados em plantas daninhas (KAUNDUN et al., 2017; LU et al., 2020).

Neste estudo foi verificado que o principal metabólito formado pela degradação de tembotrione nos biótipos resistentes é o TCMBA (M2). Esse metabólito foi verificado em plantas de *Amaranthus palmeri* tratadas com tembotrione, porém a quantidade foi similar entre biótipos resistentes e suscetíveis aos inibidores da HPPD (KÜPPER et al., 2018). O herbicida tembotrione, bem como os metabólitos M3/M4 e M5 podem sofrer clivagem da estrutura cicloexano para formar o metabólito TCMBA (Figura 21), porém os genes envolvidos neste processo são desconhecidos. Como os metabólitos M3/M4 e M5 foram observados em pequenas quantidades nos biótipos resistentes de leiteira (32.1 e 32.2), e por outro lado, M2 é rapidamente formado nestes

biótipos é provável que tembotrione seja diretamente metabolizado à TCMBA (M2), sem passar esses compostos intermediários. Nesse sentido, para verificar se a oxidação mediada por enzimas do complexo P450, pudessem estar envolvidas na metabolização de tembotrione, foi realizado um estudo com intuito de verificar se os inibidores da P450 conseguem reverter a resistência de leiteira a tembotrione, o qual é detalhado no tópico a seguir.

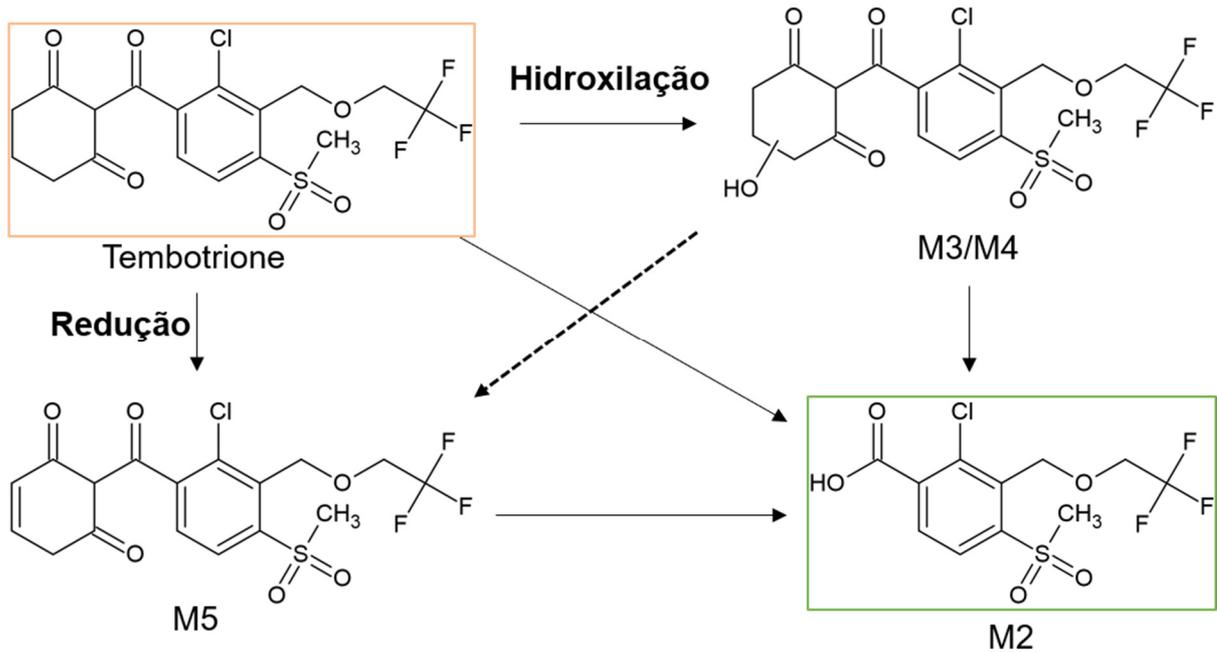


Figura 21- Estruturas químicas de tembotrione e dos metabólitos detectados nos biótipos de leiteira (10.1, 32.1 e 32.2), esquematizadas de acordo com suas prováveis vias de detoxificação. Tembotrione é mostrado em contorno laranja, enquanto os metabólitos intermediários M3/M4 e M5 são mostrados sem contorno. O principal metabólito (M2) encontrado nos biótipos resistentes (32.1 e 32.2) é mostrado em contorno verde. Capão do Leão, RS, 2022.

Dos metabólitos resultantes da detoxificação de tembotrione em plantas, M2 não exibe nenhuma atividade herbicida, M5 apesar de ser um metabólito importante, sua função, atividade herbicida e importância na detoxificação não são claros (KÜPPER et al., 2018). Por outro lado, hidroxitembotrione (M3/M4) ainda pode apresentar afinidade e capacidade de inibir a enzima HPPD (KÜPPER et al., 2018). Desta forma, de acordo com os resultados obtidos, os biótipos de leiteira resistentes apresentam a capacidade de metabolizar tembotrione em um composto atóxico, sem nenhuma atividade herbicida.

### 3.3.2 Efeito de inibidores da P450 no metabolismo de tembotrione

A análise dos resultados obtidos nos experimentos de curva de dose-resposta com inibidores da P450 nos biótipos resistentes e suscetível aos inibidores da HPPD, demonstrou não ser necessária a transformação dos dados, com base nos testes de Shapiro-Wilk e Hartley. A análise da variância indicou ocorrer interação entre os fatores testados (biótipos de leiteira x inibidores da P450 x doses de tembotrione) para as variáveis controle (30 DAT) e MSPA. Os dados se ajustaram ao modelo sigmoidal do tipo logístico, com valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) variando entre 0,95 a 0,99 (Figuras 22 e 23), demonstrando ajuste satisfatórios dos dados ao modelo.

A variação de controle do biótipo suscetível (10.1) com o aumento das doses de tembotrione, foi similar independente da presença ou ausência dos inibidores da P450 (malathion ou PBO) (Figura 22). Os inibidores da P450 não reestabeleceram a suscetibilidade nos biótipos resistentes aos inibidores da HPPD (32.1 e 32.2). Porém, foi verificado que nos biótipos resistentes, as plantas tratadas com PBO necessitaram maiores doses do herbicida tembotrione, para alcançarem o mesmo nível de controle que as plantas não tratadas com o inibidor. Por outro lado, a aplicação de malathion demonstrou pouca interferência no controle em função do aumento das doses de tembotrione, em comparação as plantas não tratadas com este inibidor da P450.

Esses resultados indicam que a hidroxilação mediada por enzimas do complexo P450 é irrelevante na resistência de leiteira a tembotrione. Esse resultado é diferente dos casos de resistência de *A. palmeri*, *A. tuberculatus* e *Raphanus raphanistrum* aos inibidores da HPPD, onde o uso de inibidores da P450 são capazes de restabelecer a sensibilidade dos biótipos resistentes, para mesotrione e tembotrione (OLIVEIRA et al., 2018; LU et al., 2020). Nas plantas, além das funções fisiológicas para a síntese de hormônios, esteróis, ácidos graxos e diversos aspectos do metabolismo secundário, as enzimas do citocromo P450 são importantes para a desintoxicação de substâncias químicas, entre as quais os herbicidas, através da hidroxilação ou dealkilação (POWLES; YU, 2010).

Malathion atua como um “substrato suicida” para as enzimas citocromo P450, devido à liberação de espécies reativas de enxofre durante seu metabolismo, nas quais podem se ligar covalentemente em determinadas enzimas P450 (CORREIA; MONTELLANO, 2005). O PBO se liga ao sítio ativo das P450 e depois é metabolizado a um complexo inibidor pseudoirreversível entre um radical carbeno do grupo metilenodioxifenil e o ferro ferroso das enzimas P450 (FEYEREISEN, 2015).

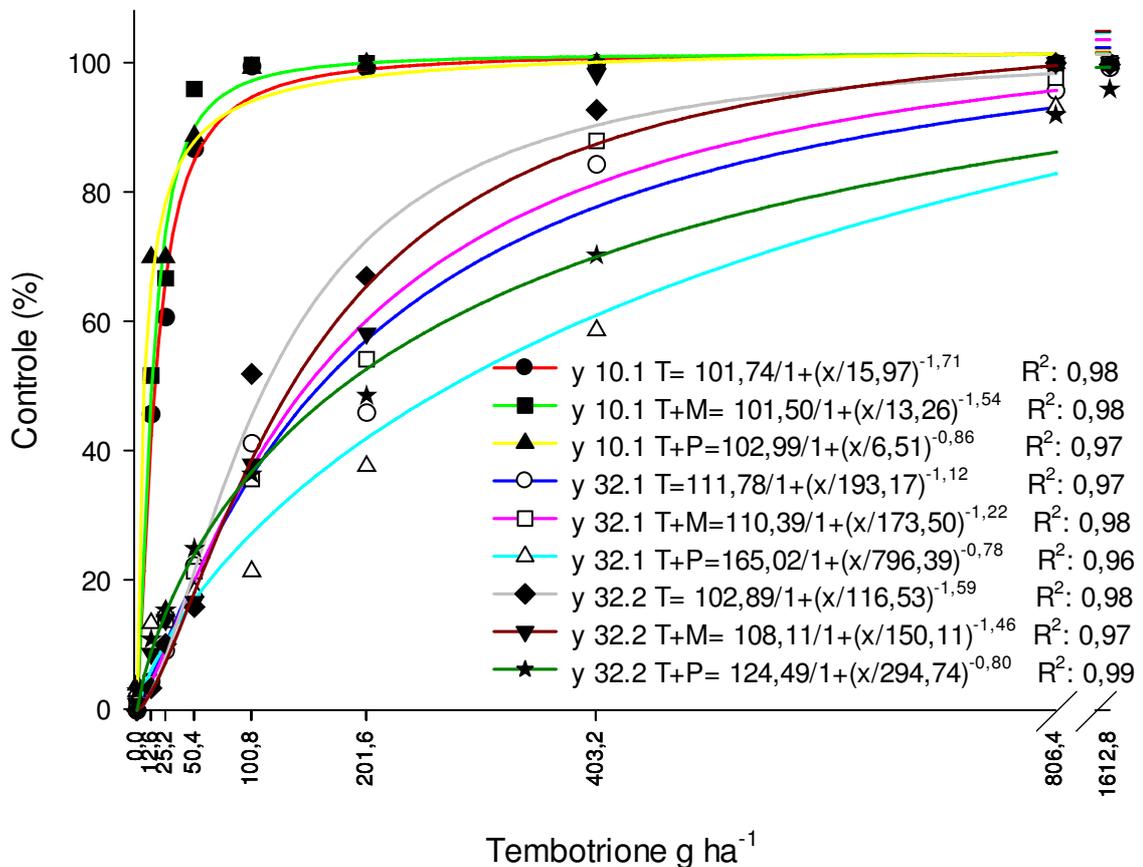


Figura 22- Controle (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida tembotrione com inibidores da P450 malathion e butóxido de piperonila. Capão do Leão, RS, 2022. T: tembotrione; M: malathion; P: butóxido de piperonila.

A aplicação em pós-emergência dos inibidores da P450 (malathion, amitrole e PBO) com herbicidas inibidores de HPPD (mesotrione, tembotrione e topramezone) mostrou potencial para reverter à resistência de *A. tuberculatus* para um fenótipo suscetível (OLIVEIRA et al., 2017a). Do mesmo modo, malation e tetciclacis reduziram significativamente o metabolismo de mesotrione em milho e *A. tuberculatus* resistente a HPPD (MA et al., 2013). Assim, esses resultados indicam que o aumento do metabolismo oxidativo da molécula de mesotrione, contribui significativamente para a ocorrência de resistência ao herbicida, e a mistura do herbicida com inibidores da P450 monooxigenase, pode restaurar a suscetibilidade dos biótipos resistentes (MA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017a). O malathion possibilitou reestabelecer a suscetibilidade para tembotrione em *Raphanus raphanistrum* resistentes aos inibidores da HPPD, no entanto para mesotrione e isoxaflutole o inibidor das enzimas P450 não apresentou efeito sinérgico (LU et al., 2020).

Os dados de redução da MSPA (%) corroboram com os resultados obtidos no ensaio de controle (Figuras 22 e 23). De maneira geral, para o biótipo 10.1 as curvas dose-resposta de tembotrione associado com malathion e PBO não afetaram a redução da MSPA em comparação a curva dose-resposta de tembotrione sem a presença de inibidores da P450 (Figura 23). Para os biótipos resistentes (32.1 e 32.2) as curvas dose-resposta de malathion com tembotrione também demonstraram percentual de redução de MSPA similar aquelas onde foi aplicado apenas o herbicida. No entanto, as curvas dose-resposta de tembotrione e PBO demonstraram uma menor redução da MSPA em comparação a ausência do inibidor da P450.

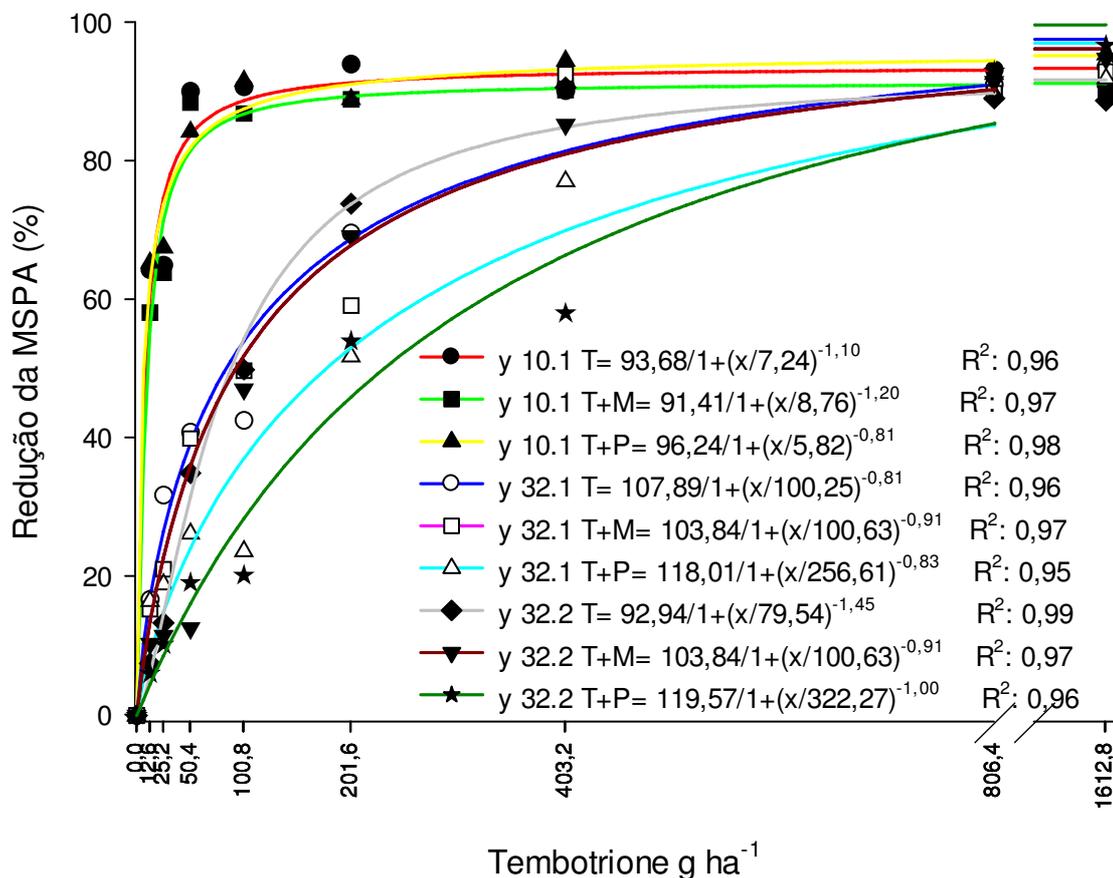


Figura 23- Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos 30 dias após a aplicação de diferentes doses do herbicida tembotrione com inibidores da P450 malathion e butóxido de piperonila. Capão do Leão, RS, 2022. T: tembotrione; M: malathion; P: butóxido de piperonila.

Os biótipos de leiteira avaliados não apresentaram alterações de controle e redução da MSPA que explicassem que o mecanismo de resistência envolvesse a metabolização mediado por enzimas da família das P450. O menor controle e redução

da MSPA dos biótipos resistentes tratados com herbicida e PBO, pode estar relacionada ao efeito protetor da nafta aromática presente na emulsão do produto comercial, contendo PBO (K-obiol®). Estes inertes presentes no produto comercial, causaram uma leve fitotoxicidade nas plantas de leiteira, e podem ter agido como “safeners” ativando enzimas antioxidantes que minimizaram o estresse oxidativo (PAWŁOWSKA et al., 2019) causado pela inibição da HPPD em função da aplicação de tembotrione.

### 3.3.3 Expressão do gene HPPD

Os níveis de expressão do gene HPPD variaram apreciavelmente de planta para planta dentro dos biótipos suscetível e resistentes, especialmente as 12 horas após a aplicação de tembotrione (Fig. 24). De maneira geral, os biótipos resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) reduzem a expressão do gene HPPD, de acordo com o incremento da exposição ao herbicida tembotrione, levando em consideração a expressão relativa aos genes de referência  $\beta$ tubulina e 18S rRNA de amostras de RNA extraídas de tecidos foliares antes (0 horas) e após o tratamento com tembotrione (12, 24 e 48H).

É importante ressaltar que os níveis de expressão da HPPD as 12, 24 e 48 horas após a aplicação de tembotrione, foram calculados para os biótipos 10.1, 32.1 e 32.2 contra o tratamento 0 horas, ou seja, sem a aplicação de tembotrione. Isto indica que a resistência à tembotrione nos biótipos 32.1 e 32.2 não se deve a níveis mais elevados do gene alvo dos herbicidas inibidores da HPPD, expresso constitutivamente ou induzivelmente após a aplicação de tembotrione as 12, 24 e 48 horas após a aplicação de tembotrione.

Todos os casos conhecidos de resistência aos inibidores da HPPD se devem ao aumento da metabolização do herbicida (HEAP, 2022), no entanto há apenas um caso envolvendo *A palmeri*, que além da metabolização, as plantas resistentes apresentam níveis basais de mRNA do gene HPPD regulados positivamente (NAKKA et al., 2017). Esse aumento na expressão do gene HPPD, variando entre 4 a 12 vezes, dependendo da população, provavelmente desempenha um papel importante na resposta inicial das populações resistentes de *A palmeri* quando realizada a aplicação de mesotrione (NAKKA et al., 2017).

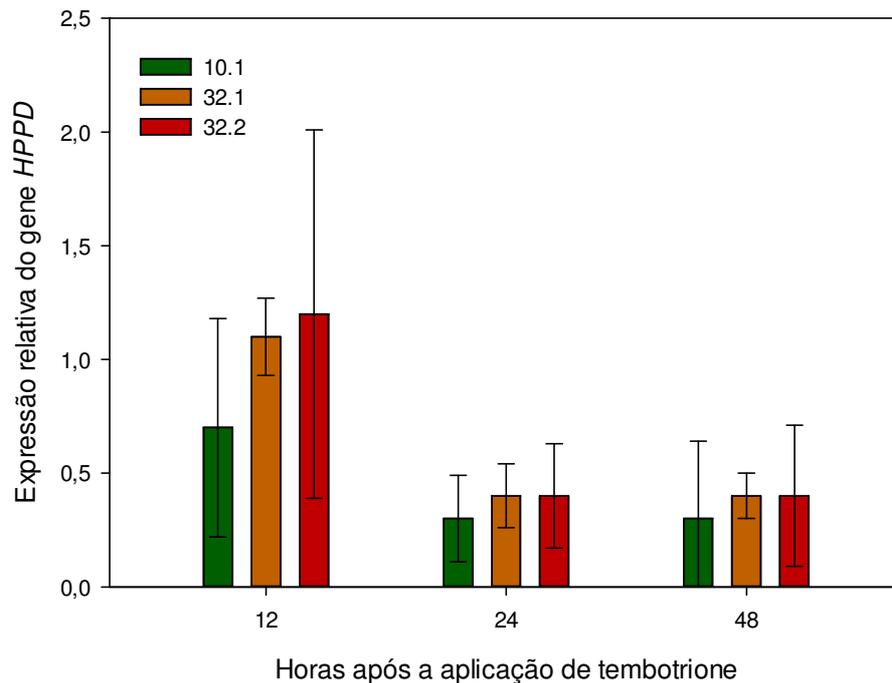


Figura 24- Expressão do gene HPPD relativa a  $\beta$ tubulina e 18S rRNA em *Euphorbia heterophylla* suscetível (10.1) e resistente (32.1 e 32.2) aos herbicidas inibidores da hidroxifenil piruvato dioxigenase, as 12, 24 e 48 horas após a aplicação de tembotrione ( $100,8 \text{ g ha}^{-1}$ ). As diferenças não foram significativas entre biótipos para cada período de coleta ( $P < 0,05$ ). Os dados foram agrupados de três experimentos (n:18). As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância ( $p \geq 0,95$ ). Capão do Leão, RS, 2022.

### 3.4 Conclusões

Os biótipos de leiteira resistentes aos inibidores da HPPD apresentam como mecanismo de resistência a rápida metabolização do herbicida tembotrione, para um metabolito atóxico denominado de TCMBA.

Não foram observadas respostas diferenciais entre os biótipos resistentes e suscetível quanto a absorção, inibição das P450 e expressão do gene HPPD.

## **4. Capítulo III – Fluorescência da clorofila, fotossíntese e resposta antioxidante de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores da HPPD em função da aplicação de tembotrione**

### **4.1 Introdução**

A hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD, EC 1.13.11.27) é a enzima alvo de uma série de herbicidas modernos que foram introduzidos recentemente ou estão em fase de desenvolvimento. Os herbicidas que inibem a HPPD são baseados na funcionalidade quelante, na qual o herbicida se liga ao centro ferro redox ativo da enzima, bloqueando a catálise (WITSCHERL, 2009). Com a inibição catalítica, não ocorre conversão de tirosina em ácido homogentísico, precursor de tocoferóis, tocotrienóis e prenil quinonas, como a plastoquinona (DAYAN; ZACCARO, 2012; XU et al., 2019).

A plastoquinona é um transportador de elétrons solúvel que liga os aceptores de elétrons primários do FSII (QA e QB) ao citocromo b<sub>6</sub>f, promovendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas (XU et al., 2019). Através do fluxo de elétrons gerado é formado o gradiente de prótons transtilacoidal necessário para a síntese de ATP cloroplástico. A plastoquinona, em seus estados reduzido (PQH<sub>2</sub>) e oxidado (PQ) regulam o estado de transição (1 e 2), ativando LHCII quinases e fosfatases, que ajustam a captação de energia nas antenas dos FSII e FSI, para que haja um equilíbrio do fluxo e excitação de elétrons entre os fotossistemas (ZITO et al., 1999; ALLEN et al., 2003). A plastoquinona também participa da fotoproteção dos fotossistemas, servindo como reservatório de sequestro de oxigênio singleto (KSAS et al., 2018), além de ser um cofator essencial da fitoeno dessaturase e da zeta-caroteno dessaturase, ambos envolvidos na rota de biossíntese de carotenoides (LEE et al., 1997).

Com a inibição da HPPD e paralização na síntese de plastoquinona, ocorre a sobrecarga dos fotossistemas por dois fatores principais. Primeiramente, a plastoquinona presente na cadeia transportadora de elétrons não é regenerada, interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Essa paralização do fluxo impede que a clorofila excitada dissipe sua energia, promovendo a formação de clorofila em seu estado tripleto, que reagirá com o O<sub>2</sub> presente nos cloroplastos, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio e posterior peroxidação lipídica (DAYAN et al., 2007). Associado a isso, a redução na concentração de carotenoides pode aumentar a sensibilidade do aparato fotossintético ao estresse oxidativo, uma vez que esses pigmentos são conhecidos por serem poderosos antioxidantes (LOHR et al., 2005).

As xantofilas (carotenoides polares), participam do processo de dissipação do excesso de energia através do ciclo das xantofilas nos fotossistemas (THIELE; KRAUSE, 1994). Os  $\alpha$ -tocoferóis são antioxidantes lipídicos, que estão presentes nas membranas dos tilacóides e atuam na dissipação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e OH<sup>-</sup>, sendo que a diminuição do conteúdo de tocoferóis pode favorecer a peroxidação lipídica em condições de estresse (GODAR et al., 2015; KIM et al., 2021). Com a síntese de plastoquinona e, por consequência de carotenoides interrompida, ocorre a degradação dos pigmentos existentes e a não regeneração dos mesmos, bem como a sobrecarga de energia nos complexos de coleta de energia dos fotossistemas, potencializa o estresse oxidativo. A degradação dos pigmentos fotoprotetores promove o branqueamento característico dos inibidores da HPPD (XU et al., 2019).

Quando plantas suscetíveis são expostas a herbicidas inibidores da HPPD, a inibição da síntese de pigmentos fotoprotetores e plastoquinona acarretam na geração EROs em quantidades acima do que os mecanismos de eliminação conseguem suportar, especialmente sob condições de elevada radiação (GODAR et al., 2015; XU et al., 2019). A acumulação de EROs gera danos aos componentes celulares, incluindo a degradação oxidativa da clorofila e das membranas fotossintéticas, interrompendo de forma irreversível o metabolismo das plantas (JUNG et al., 2008; WANG et al., 2020). Por outro lado, a prevenção do dano oxidativo às células durante o estresse ocorre através dos mecanismos de tolerância ao estresse, especialmente pelo aumento da atividade do sistema antioxidante.

A acumulação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e do radical malondialdeído (MDA) são bons indicadores de estresse oxidativo nas folhas (JUNG et al., 2008), portanto, mudanças na concentração de  $H_2O_2$  e MDA em um tecido estão interligados com a integridade estrutural das membranas de plantas suscetíveis aos herbicidas inibidores da HPPD. O metabolismo das EROs é dependente da atividade antioxidante enzimática e não-enzimática. Dentre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) catalisa a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , enquanto a catalase (CAT; EC 1.11.1.6) é a enzima diretamente responsável pela remoção de  $H_2O_2$ , sendo a água o produto primário da reação (CAVERZAN et al., 2019). O ascorbato também pode remover diretamente  $H_2O_2$  em uma reação que requer a enzima ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) (CAVERZAN et al., 2019). As plantas também contêm eliminadores de EROs não enzimáticos, como o ascorbato, tocoferóis, glutatona, prolina, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides, localizados em diferentes compartimentos celulares (CAVERZAN et al., 2019).

Os biótipos de leiteira coletados no Rio Grande do Sul apresentaram diferentes níveis de controle após aplicação de tembotrione e os ensaios de curva dose-resposta sugeriram a existência de biótipos resistentes (SILVA et al., 2016). Porém, a alteração na fluorescência da clorofila, na fotossíntese, na produção e eliminação de EROS e o dano celular causado pela aplicação do herbicida tembotrione entre biótipos resistentes e suscetíveis não foram elucidados. Desta forma, objetivou-se com este trabalho verificar as alterações na fluorescência da clorofila, na fotossíntese, na produção e eliminação de EROs, e o dano celular causado pela aplicação do herbicida tembotrione em biótipos resistentes e suscetíveis aos inibidores da HPPD.

## **4.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, pertencentes ao Centro de Herbologia (CEHERB), na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/FAEM UFPel. Para a realização dos experimentos, plantas de leiteira foram semeadas em bandejas e transferidas, na fase de plântula, para copos preenchidos com solo, conforme descrito no capítulo I. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, com quatro repetições. O fator A foi composto pelos biótipos de leiteira 10.1 (susceptível), 32.1 e 32.2 (resistentes) ao herbicida tembotrione. Já o fator B, consistiu dos tempos após a aplicação do herbicida (0, 24, 48, 96 e 192 horas).

A aplicação de tembotrione ( $100,8 \text{ g ha}^{-1}$  + óleo metilado de soja 0,5% v/v) foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de quatro folhas, com auxílio de pulverizador pressurizado a  $\text{CO}_2$ , com pontas de ar induzido 0.15 e vazão de  $150 \text{ L ha}^{-1}$ . Nos tempos correspondentes, foram realizadas as avaliações de fotossíntese e fluorescência da clorofila, bem como, coletadas a 3° e 4° folha dos biótipos de leiteira. A avaliação de extravasamento de eletrólitos foi realizada com o material fresco, enquanto para realização das demais análises, o material vegetal foi congelado em ultra freezer a  $-80^\circ\text{C}$  até a realização das análises no laboratório de metabolismo vegetal do CEHERB.

#### **4.2.1 Fluorescência da clorofila**

Os dados de fluorescência da clorofila foram obtidos utilizando fluorômetro portátil OS30p (Opti-Sciences). As variáveis analisadas foram a fluorescência inicial ( $F_0$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ). A partir dos dados obtidos foram calculadas a fluorescência variável ( $F_v$ ) através da equação  $F_v = F_m - F_0$ , e o rendimento quântico máximo do FSII, através da equação  $F_v/F_m$ . As medições foram realizadas na 3° e 4° folha dos biótipos de leiteira, após a incubação da folha no escuro por 30 minutos. Foi realizada uma medição para cada repetição de cada biótipo de leiteira, em cada período de exposição ao herbicida tembotrione.

#### **4.2.2 Tocas gasosas**

As variáveis fotossintéticas foram realizadas utilizando o aparelho *Infra-Red Gas Analyzer-IRGA* (LI6400). Foram mensuradas a taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), concentração subestomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), condutância estomática ( $G_s$ ) e transpiração ( $E$ ). Foram calculadas a eficiência da carboxilação ( $CE$ ) e eficiência instantânea do uso da água ( $EUA$ ), através das equações  $A/C_i$  e  $A/E$ , respectivamente. A concentração de  $\text{CO}_2$  dentro da câmara foliar foi fixada em  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  e o fluxo de fótons foi de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pois neste valor, o incremento da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos não acarretava no aumento da taxa fotossintética (dados não apresentados). O déficit de pressão de vapor ( $DPV$ ) e temperatura foliar foram os mesmos medidos na atmosfera circundante da folha. As medições foram realizadas na 3° e 4° folhas de cada repetição.

#### 4.2.3 Clorofila, carotenoides, TBars, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extravasamento de eletrólitos

Os teores de clorofilas e carotenoides foram determinados com amostras de 0,1 g de folhas de leiteira inseridas em tubos com 5 mL de DMSO (dimetilsulfoxido). O material foi incubado em banho-maria a 70° C, por duas horas, para solubilização dos pigmentos. Posteriormente, os tubos foram homogenizados e quantificado os teores de clorofila total a, b, total (a+b) e carotenoides, a partir da absorbância da solução obtida por espectrofotometria nos comprimento de onda de 647, 663 e 470 nm. Os valores obtidos foram calculados pelo uso das fórmulas de Lichtenthaler (1987), sendo os resultados expressos em mg g<sup>-1</sup> de massa fresca.

Os danos celulares nos tecidos foram determinados através do teor de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de aldeído malônico (MDA) e extravassamento de eletrólitos. Para proceder-se as análises de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TBARS, 0,2 g de folhas foram maceradas com nitrogênio líquido, homogeneizados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos. Para a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adicionaram-se alíquotas de 0,2mL do sobrenadante em 0,8mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1M. A solução repousou por 10 minutos em temperatura ambiente, e quantificou-se a absorbância a 390 nm. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada através de curva padrão e expressa em μM g<sup>-1</sup>. Para determinar TBARS, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante, foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) e ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos e a absorbância foi quantificada a 532nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. Calculou-se a concentração de MDA utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM cm<sup>-1</sup>, expressando-se resultados em nM MDA g<sup>-1</sup>.

Para avaliação do extravasamento de eletrólitos, 0,2g de amostra de folhas frescas foram seccionadas com tesoura em um único fragmento. Em seguida, foram lavadas três vezes com água ultrapura para a retirada de resíduos. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em 50 mL de água ultrapura e incubadas por 4 horas em banho-maria (25°C). Decorrido esse período, obteve-se a condutância inicial (Ci) utilizando-se condutivímetro (Lutron, CD-4301). Posteriormente a essa leitura, as mesmas amostras foram colocadas em banho maria a 90°C por 2 horas e realizada a segunda leitura (Cf). A permeabilidade relativa foi calculada pela relação Ci/(Ci+Cf) x 100 e o resultado expresso em percentagem.

#### 4.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes

Para determinar a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido desmutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalases (CAT) foi realizada a extração, onde 0,2g de amostra foram maceradas em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido e 0,02g de polivinilpirrolidona (PVPP). Em seguida foi adicionado 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 200 mM (pH 7,8), 18  $\mu\text{L}$  de EDTA 10 mM, 180  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 200 mM e 702  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e centrifugado a 14000 rpm, a 4°C por 20 minutos. A partir deste extrato quantificou-se a proteína das amostras pelo método de Bradford (1976), adicionando-se 60  $\mu\text{L}$  do extrato em 2 mL de solução de Bradford, realizando-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Através da elaboração da curva padrão com globulina, os resultados foram expressos em miligramas de proteína (mg proteína) por grama de matéria fresca (MF).

A atividade da SOD foi determinada segundo metodologia adaptada de Peixoto et al. (1999), a partir Del Longo et al. (1993) e Giannopolitis e Ries (1977). Determinou-se a inibição da redução do NBT (*p*-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando-se assim, a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para se obter 50% de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. Para a reação, foi adicionado no tubo de ensaio 1mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 400  $\mu\text{L}$  de metionina 70 mM, 20  $\mu\text{L}$  de EDTA 10  $\mu\text{M}$ , 390  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 150  $\mu\text{L}$  de NBT 1mM, 20  $\mu\text{L}$  de riboflavina 0,2 mM e 20  $\mu\text{L}$  de extrato. Em seguida os tubos foram incubados em câmara iluminada com lâmpada fluorescente de 15 Watts, por período de 10 minutos, sendo então realizada a leitura da absorbância a 560 nm. Para efeito de cálculo, o branco da reação consistiu de tubos de ensaio que não continham extratos, exposto e não expostos à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50 % da reação de NBT e expressa em UA  $\text{mg}^{-1}$  proteína  $\text{minuto}^{-1}$ .

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (coeficiente de extinção 39,4  $\text{mM cm}^{-1}$ ). A mistura de reação continha 1mL do tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 850  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 250 mM e 50  $\mu\text{L}$  do extrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm, durante 90 segundos, com leituras em intervalos de 7 segundos.

A atividade da APX foi determinada pelo consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (coeficiente de extinção  $2,9\text{mM cm}^{-1}$ ). A mistura de reação apresentou 1mL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 750  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 100  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM e 50  $\mu\text{L}$  do extrato. A leitura da absorbância no comprimento de onda de 290 nm foi realizada durante 90 segundos, com leituras em intervalos de 7 segundos. Tanto a atividade da CAT quanto para da APX, para efeito de cálculos, considerou-se que o decréscimo de uma unidade de absorbância é equivalente a uma unidade ativa (UA). As atividades do extrato total foram determinadas a partir da quantidade de extrato que reduziu a leitura de absorbância em uma UA, e expressos em  $\text{UA mg}^{-1} \text{ proteína minuto}^{-1}$ .

Os dados de fluorescência da clorofila, fotossíntese, danos celulares e atividade antioxidante foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homocedasticidade pelo teste de Hartley e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em caso de significância, comparou-se os fatores tempo de coleta e os biótipos de leiteira através de regressões.

### 4.3 Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados segundo a ordem descrita no material e métodos.

#### 4.3.1 Fluorescência da clorofila

A análise de variância evidenciou significância estatística para todas as variáveis estudadas. Para fluorescência inicial ( $F_0$ ) os dados ajustaram-se ao modelo exponencial quadrático, enquanto fluorescência máxima ( $F_m$ ) e eficiência fotossintética máxima ( $F_v/F_m$ ) se ajustaram ao modelo exponencial decrescente de dois parâmetros, onde os coeficientes de variação ( $R^2$ ) variaram entre 0,73 a 0,99.

A  $F_0$  demonstrou alterações diferenciadas entre o biótipo suscetível e os biótipos resistentes (Figura 25). Para o suscetível houve incremento significativo dos valores de fluorescência entre 48 e 96 horas após a aplicação de tembotrione. Para os biótipos resistentes os valores permaneceram estáveis nas primeiras 96 horas, com incremento próximo a 2 vezes 192 h após a aplicação, em comparação a avaliação realizada às 0 h.

A  $F_0$  é a fluorescência quando QA (quinona receptora primária de elétrons do FSII) está totalmente oxidada e o centro de reação do FSII está aberto, situação

próxima à ativação das reações fotoquímicas (MOUGET; TREMBLIN, 2002). Dessa forma, F0 é independente dos eventos fotoquímicos e o incremento dos valores pode ser consequência de danos no centro de reação do FSII ou da redução da capacidade de transferência da energia de excitação da antena para o centro de reação (BAKER; ROSENQVST, 2004). Assim, pode ser verificado que, no biótipo suscetível a transferência de energia foi rapidamente comprometida (48 h após a aplicação de tembotrione), enquanto para os biótipos resistentes isso ocorreu mais tarde, somente as 192 h. Rápido comprometimento na transferência de energia e de danos nos fotossistemas também foi verificado após aplicação de paraquat (inibidor do FSI), onde os valores de F0 aumentaram até 36 horas após aplicação do herbicida e posteriormente reduziram até chegar a zero, onde ocorreu morte da planta (HASSANNEJAD et al., 2020).

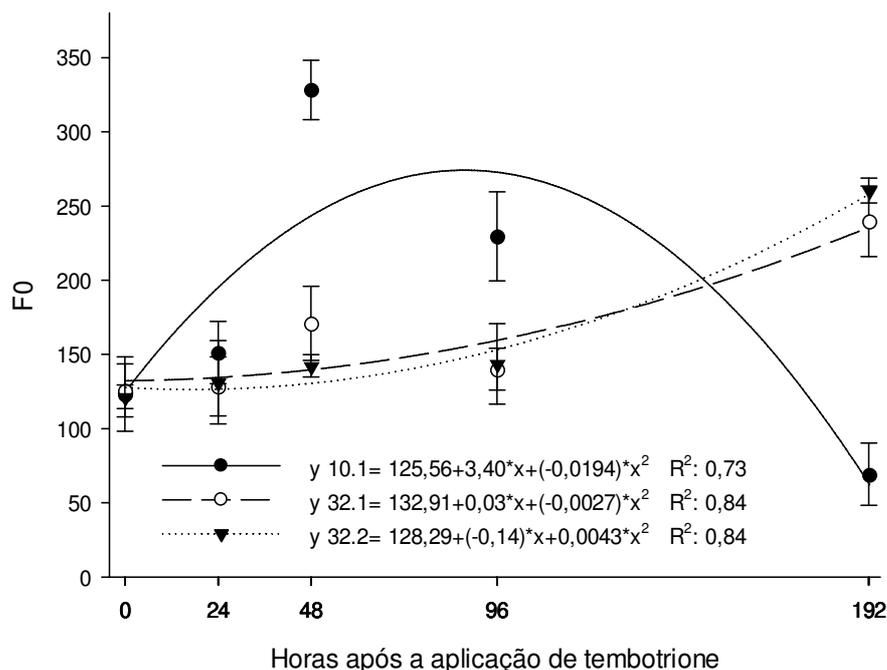


Figura 25- Fluorescência inicial (F0) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

A redução da F0 do biótipo suscetível, 192 h após a aplicação de tembotrione, pode ser devido à degradação dos pigmentos responsáveis pela captação de energia nas antenas dos fotossistemas, resultando em menor fluorescência pela menor quantidade de pigmentos, ao invés de reparos dos danos no centro de reação do FSII

ou reestabelecimento da capacidade de transferência da energia de excitação da antena para o centro de reação.

A Fm reduziu em todos os biótipos com o decorrer do período de exposição ao herbicida tembotrione (Figura 26). No entanto, a redução foi mais consistente no biótipo suscetível, com decréscimo de 3,1 e 11,1 vezes, às 96 e 192 horas após aplicação, respectivamente, quando comparado ao controle (0h após a aplicação de tembotrione). Para os biótipos resistentes, a redução foi menos severa, pois os valores de Fm reduziram próximo a 1,8 vezes, para ambos biótipos (32.1 e 32.2), em comparação ao tempo 0 de exposição ao herbicida tembotrione.

A Fm indica a intensidade máxima de fluorescência que ocorre quando praticamente toda QA está reduzida e os centros de reação são incapazes de aumentar as reações fotoquímicas, atingindo sua capacidade máxima (BAKER; ROSENQVST, 2004). Durante o processo fotossintético, parte da energia luminosa absorvida é utilizada na produção de energia e parte é liberada na forma de calor e fluorescência. Nesse sentido, quando submetidas a condições de estresse, como é o caso do uso de herbicidas, há tendência de aumento nos níveis de fluorescência pela redução na eficiência no transporte de elétrons e menor aproveitamento da energia luminosa (RASTOGI et al., 2019). Entretanto, quando ocorre a rápida paralização no fluxo de elétrons, ocasionados pela fotoinibição, é comum ocorrer a redução nos níveis desta variável, como observado para bentazone (inibidor do FSII) e paraquat (inibidor do FSI) (HASSANNEJAD et al., 2020).

No presente trabalho, pode-se observar que com o decorrer da exposição ao herbicida tembotrione, especialmente para o biótipo suscetível, as intensidades máximas de fluorescência foram reduzidas, indicando que a inibição da HPPD e conseqüentemente, o bloqueio da síntese de carotenoides desestruturou o complexo antena do FSII, reduzindo a absorção de energia luminosa e, por conseqüência o fluxo de elétrons e dissipação de energia. Similarmente, a aplicação na presença de luz de sulcontrione (inibidor da HPPD) e norflurazon (inibidor da PDS), ambos envolvidos na inibição da síntese de carotenoides, acarretou na redução de aproximadamente 50% no transporte de elétrons para ambos herbicidas após 6 horas da aplicação (DAYAN; ZACCARO, 2012).

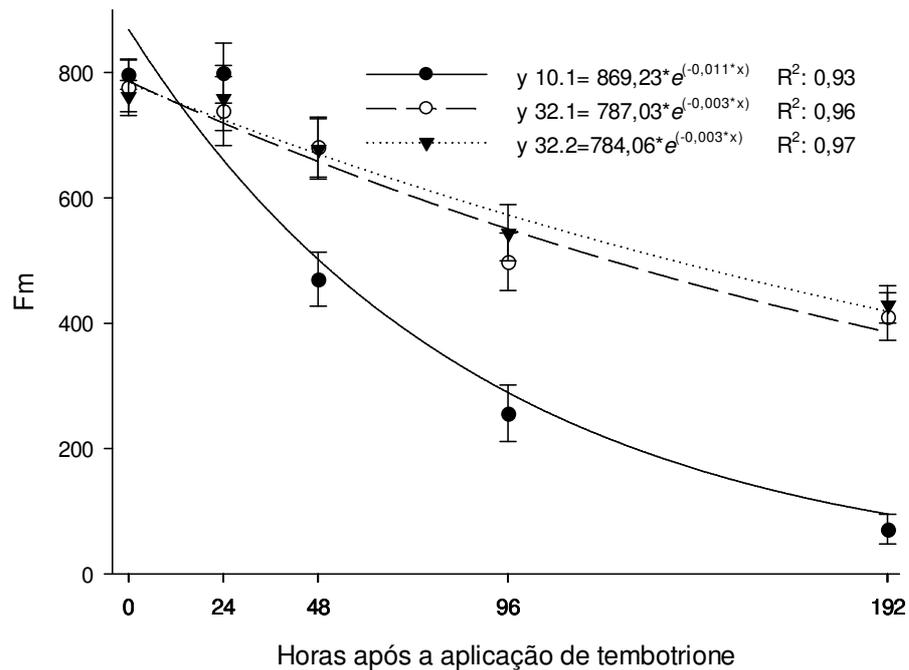


Figura 26- Fluorescência máxima (Fm) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

A razão Fv/Fm fornece um indicador robusto do rendimento quântico máximo do FSII (BAKER; ROSENQVST, 2004). Em plantas não estressadas, a razão Fv/Fm é consistente, com valores próximos a 0,83, e se correlaciona com o rendimento quântico máximo da fotossíntese (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987). A existência de qualquer tipo de estresse que resulte em dano de inativação do FSII acarreta na redução da razão Fv/Fm (LONG et al., 2006). Isso faz da mensuração da Fv/Fm uma das técnicas mais comuns para medir o "estresse" nas folhas.

A Fv/Fm decresceu com o maior período de exposição ao tembotrione (Figura 27). Porém, para o biótipo suscetível o decréscimo nesta variável foi mais pronunciado do que para os biótipos resistentes. No biótipo suscetível, a eficiência quântica do FSII demonstrou redução de 65% as 48 horas após a aplicação de tembotrione, evoluindo para 95% as 192 horas. Enquanto nos biótipos resistentes a redução foi mais gradual, alcançando aproximadamente 50% de redução da eficiência quântica do FSII às 192 horas após a aplicação de tembotrione.

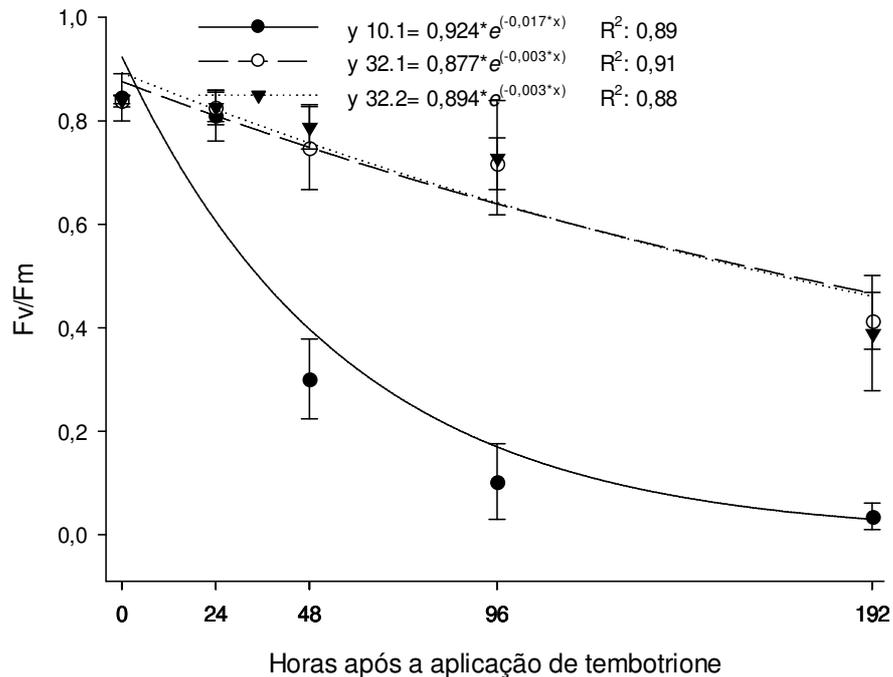


Figura 27- Rendimento quântico máximo do FSII (Fv/Fm) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

#### 4.3.2 Tocás gasosas

A análise de variância evidenciou significância estatística, para todas as variáveis analisadas. Para fotossíntese líquida (A), concentração de CO<sub>2</sub> subestomática (C<sub>i</sub>), eficiência da carboxilação (CE), e eficiência do uso da água (EUA), os dados foram ajustados ao modelo exponencial quadrático, enquanto condutância estomática (G<sub>s</sub>) e taxa de transpiração (E) se ajustaram ao modelo de distribuição de Gauss de três parâmetros, onde os coeficientes de variação (R<sup>2</sup>) variaram entre 0,72 a 0,97.

A análise dos parâmetros fotossintéticos demonstrou que os biótipos resistentes a HPPD (32.1 e 32.2) apresentam redução menos abrupta da A com o decorrer do período após a aplicação de tembotrione, em comparação ao biótipo suscetível (10.1) (Figura 28). Após 48 horas de exposição ao herbicida, o biótipo suscetível apresentou valores de A próximos a 0, nos quais evoluíram para negativos com o decorrer das avaliações. Isso evidencia a paralisação completa da fotossíntese, sendo o incremento do CO<sub>2</sub> decorrente do processo de respiração celular. Por outro lado, os biótipos resistentes necessitaram próximo de 192 horas para que A se

aproximasse de 0, indicando que os efeitos do estresse decorrentes da inibição da HPPD são mais precoces e pronunciados no biótipo 10.1.

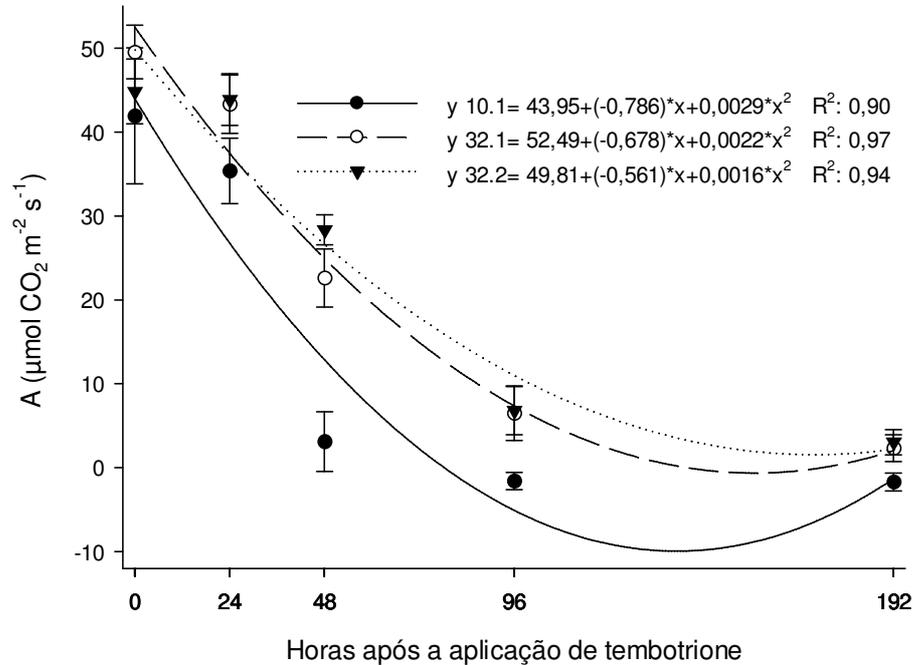


Figura 28- Fotossíntese líquida (A) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Em relação a Ci verificou-se maior incremento desta variável para o biótipo suscetível no período de avaliação, quando comparado aos biótipos resistentes (Figura 29). O biótipo suscetível demonstrou níveis de Ci acima de 400 μmol de CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> a partir das 96 horas após a aplicação do herbicida, sendo os valores acima dos 400 ppm, supridos pelo aparelho. Isso indica, que o estresse causado pelo herbicida levou a completa paralisação da atividade de carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), e conseqüentemente a nulidade de consumo de CO<sub>2</sub>. O saldo positivo entre a diferença do Ci e CO<sub>2</sub> suprido pelo IRGA, deriva da liberação de CO<sub>2</sub> pela planta, através de processos metabólicos que visam manter a quantidade necessária de poder redutor e ATP para o metabolismo vegetal, bem como, atenuar os efeitos fitotóxicos do estresse causado pelo herbicida.

Os biótipos resistentes também demonstraram incremento do Ci no decorrer do período avaliado. No entanto os valores foram inferiores ao biótipo suscetível, especialmente no período compreendido entre as 48 e 192 horas. Isso indica que os biótipos resistentes são afetados pela exposição do herbicida, reduzindo a

fotossíntese e consumo de CO<sub>2</sub> para níveis basais, mas não ocorre a paralisação completa da fotossíntese como ocorre no biótipo suscetível.

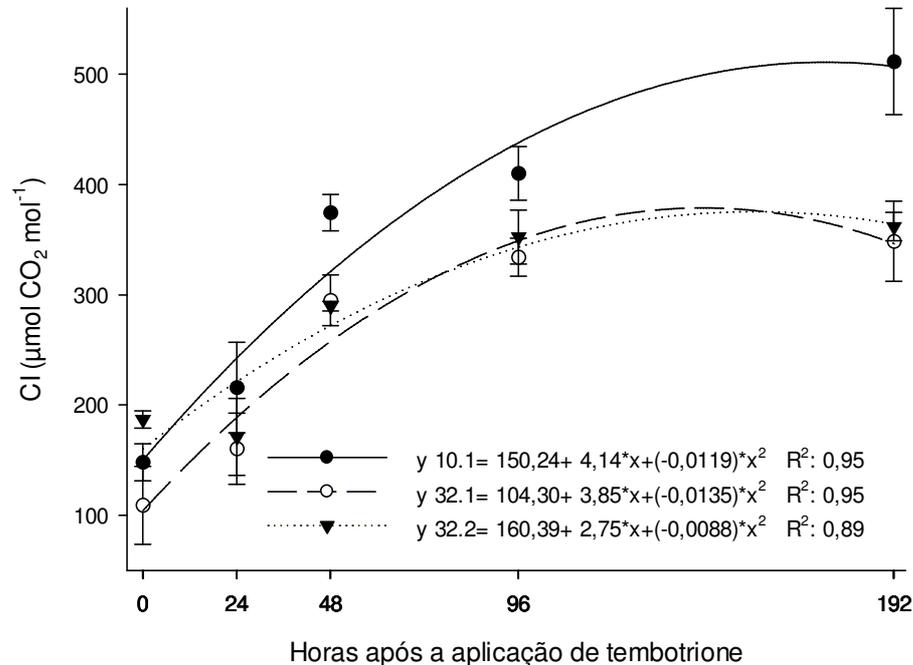


Figura 29- Concentração de CO<sub>2</sub> subestomática (Ci) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Para Gs, observou-se nas primeiras 48 horas tendência de aumento desta variável, com redução mais expressiva a partir das 96 horas (Figura 30). No entanto, após este aumento inicial, verificou-se redução nos níveis de Gs, com decréscimos maiores no biótipo suscetível, chegando a valores próximos de 0 mol de H<sub>2</sub>O m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. A Gs está relacionada com a abertura dos estômatos, ou seja, a resistência associada à difusão de CO<sub>2</sub> pela abertura estomática. As mudanças na resistência estomática são importantes para a regulação da perda de água pela planta e para o controle da taxa de absorção de CO<sub>2</sub> necessário para fixação durante a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2015).

A aplicação de mesotrione ocasionou diminuição na A, aumento de Ci e redução da Gs em cultivares de mandioca mais suscetíveis ao herbicida (SILVEIRA et al., 2013), similar ao observado neste estudo. Isso demonstra que os herbicidas inibidores da HPPD alteram o metabolismo de assimilação de carbono conforme o grau de tolerância/resistência, reduzindo a taxa fotossintética, além de reduzir a condutância estomática, acarretando na diminuição do grau de abertura estomática.

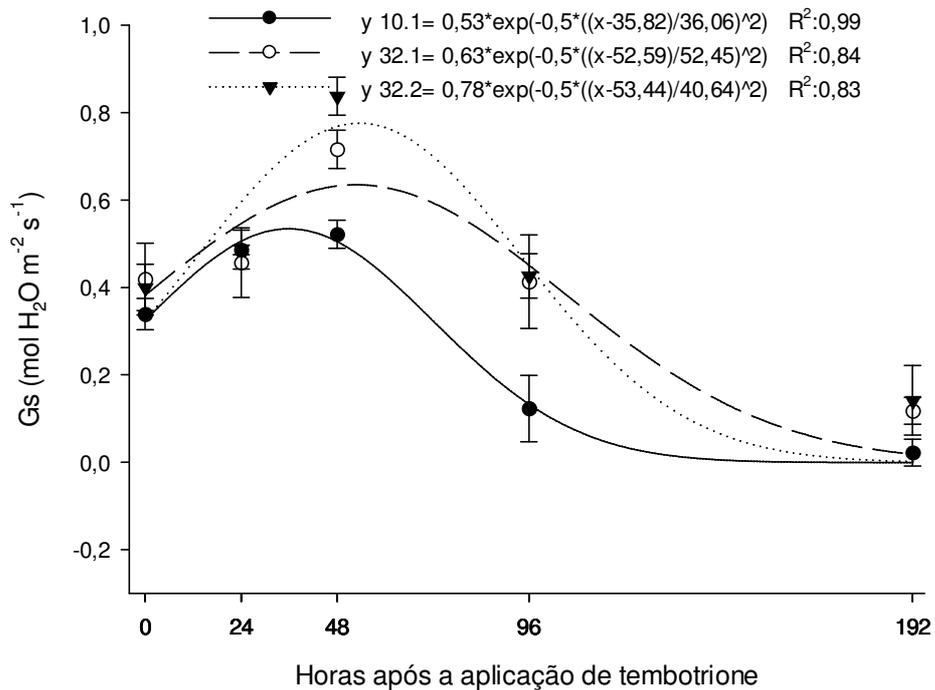


Figura 30- Condutância estomática (Gs) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

A taxa de transpiração apresentou comportamento similar a Gs, uma vez que as duas variáveis estão interligadas, pois a maior resistência à difusão dos gases acarreta em uma menor taxa de transpiração provocada pela redução da abertura estomática (Figura 30 e 31). Os processos de transpiração, condutância estomática e captura de CO<sub>2</sub> só ocorrem quando os estômatos estão abertos. Assim, a transpiração é determinada principalmente pela Gs e duas variáveis físicas: a radiação solar e o déficit de saturação atmosférica (TAIZ; ZEIGER, 2015).

Os valores observados da E do biótipo 10.1 foram próximos da nulidade após as 48 horas de exposição ao herbicida tembotrione, enquanto os biótipos 32.1 e 32.2 apresentaram valores similares no tempo 0 e as 48 h (5 mmol de H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), reduzindo para 1,6 e 2,8 mmol de H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, para os biótipos 32.1 e 32.2 respectivamente, na avaliação 192 h após aplicação (Figura 31). O declínio da transpiração está associado ao fechamento dos estômatos, e as variações na abertura estomática causam alterações no potencial hídrico, por atuarem sobre a taxa transpiratória (GALON et al., 2010). A planta tende a fechar os estômatos quando a quantidade de fótons que atinge a superfície foliar está abaixo da radiação

fotossinteticamente ativa, ou como estratégia de sobrevivência a condições de estresse, seja hídrico, por metais pesados ou xenobióticos (SOUSA et al., 2012; GIANNAKOULA et al., 2021; SILVEIRA et al., 2013).

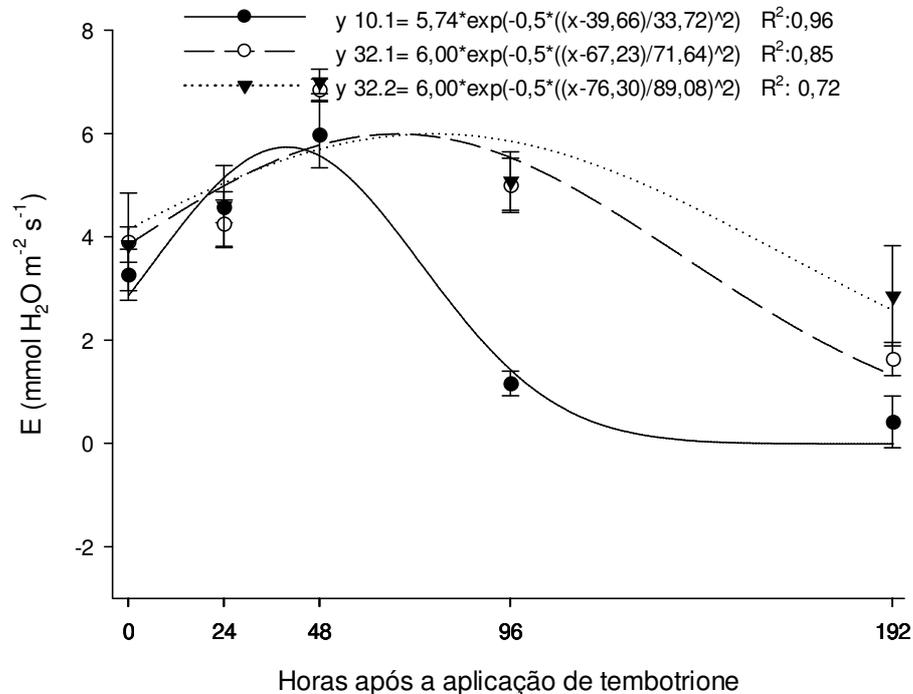


Figura 31- Taxa de transpiração (E) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Sob condições de elevada radiação, os herbicidas inibidores da HPPD afetam drasticamente a atividade do FSII e os processos de dissipação de energia não fotoquímica (XU et al., 2019). Em plantas suscetíveis, esses herbicidas impedem a recuperação completa dos danos ao FSII em resposta ao excesso de energia luminosa (XU et al., 2019). A incapacidade do sistema antioxidante em dissipar o excesso de EROs, formados nos fotossistemas, interrompe a fase fotoquímica e consequentemente a fase bioquímica da fotossíntese (XU et al., 2019; KHOROBRYKH et al., 2020). A ausência de poder redutor e ATP em função da paralisação do transporte de elétrons nos fotossistemas, acarreta na paralisação do consumo de CO<sub>2</sub>, que acarreta no fechamento estomático e bloqueio das trocas gasosas.

Em relação aos biótipos de leiteira, pode-se inferir que o biótipo suscetível aos inibidores da HPPD apresenta uma precoce e elevada paralisação do consumo de

CO<sub>2</sub> e das trocas gasosas. Por outro lado, os biótipos resistentes demonstraram maior resiliência a essas alterações, com efeitos menos pronunciados e ocorrendo mais tardiamente do que no biótipo suscetível.

A eficiência de carboxilação (CE) representa, indiretamente, a atividade da rubisco. O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> dentro do mesófilo foliar induz aumentos na eficiência fotossintética, principalmente por inibir a atividade oxigenase da Rubisco, em condições que energia e poder redutor não limitam a atividade das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin (LONG et al., 2006). Ambos os biótipos apresentaram redução da CE, no decorrer do período avaliado (Figura 32), no entanto, a redução da CE foi significativamente menor no biótipo suscetível em comparação aos resistentes.

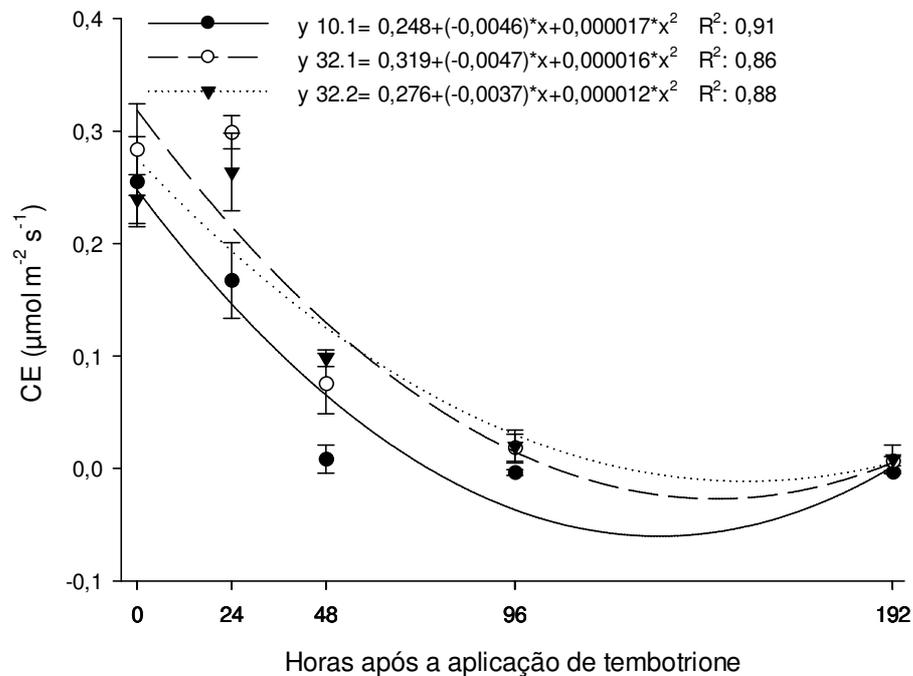


Figura 32- Eficiência da carboxilação (CE) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

A redução da CE nos biótipos estudados se deve principalmente aos efeitos causados pela interrupção do transporte de elétrons nos fotossistemas, em função da paralisação da síntese de plastoquinona e carotenoides, através da inibição da HPPD pelo herbicida tembotrione. Uma vez que, a quantidade CO<sub>2</sub> subestomática, não limitou a atividade de carboxilação da Rubisco, e o aumento no C<sub>i</sub> está atrelada a redução diferencial entre os biótipos na quantidade de energia (ATP) e poder redutor

(NADPH) produzida na fase fotoquímica para manter o ciclo de Calvin e consequentemente o consumo de CO<sub>2</sub>.

A EUA apresentou comportamento similar a CE, onde o biótipo suscetível apresentou redução mais precoce e consistente, quando comparado aos biótipos resistentes (Figura 33). A eficiência do uso da água mostra a relação entre a quantidade de água evapotranspirada de determinada planta para a produção de certa quantidade de matéria seca (CONCENÇO et al., 2009). Assim, plantas mais eficientes no uso da água produzem mais matéria seca por grama de água transpirada (GALON et al., 2010).

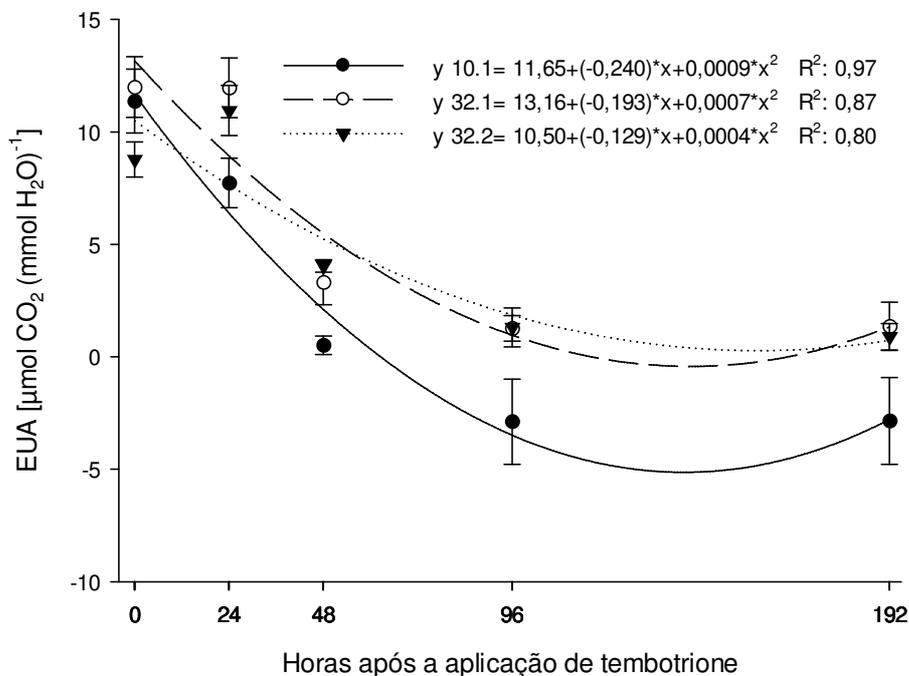


Figura 33- Eficiência do uso da água (EUA) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1), em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

O uso mais eficiente da água está diretamente correlacionado ao tempo de abertura estomática, pois enquanto a planta absorve CO<sub>2</sub> para a fotossíntese, a água é perdida por transpiração, com intensidade variável, dependendo do gradiente de potencial entre a superfície foliar e a atmosfera, seguindo uma corrente de potenciais hídricos (CONCENÇO et al., 2009). Como os biótipos resistentes apresentaram maior A, E, Gs e menor Ci a EUA foi maior nestes biótipos em comparação ao biótipo suscetível.

#### 4.3.3 Clorofila, carotenoides, TBars, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extravasamento de eletrólitos

A análise de variância demonstrou efeito simples para horas após a aplicação de tembotrione, para as variáveis clorofila *a* e clorofila *b* (dados não apresentados). Para as demais variáveis analisadas, ocorreu interação entre os fatores biótipos de leiteira e horas após a aplicação de tembotrione, onde os dados se ajustaram ao modelo exponencial quadrático.

A composição de pigmentos de *E. heterophylla* exposta ao inibidor da HPPD foi alterada com o decorrer do período de exposição ao herbicida (Figura 34 e 35). O conteúdo de clorofila total diminuiu na presença de tembotrione em 26,3%, 14,4%, 18,7% respectivamente, para os biótipos 10.1, 32.1 e 32.2 quando comparado o tempo 0 h com último período de avaliação realizado, 192 h após aplicação (Figura 34). Nos períodos intermediários de avaliação (24, 48 e 96 h) o conteúdo de clorofila foi pouco afetado pela exposição ao herbicida.

A redução mais expressiva no conteúdo de clorofila 192h após a aplicação do herbicida, especialmente para o biótipo suscetível se deve ao mecanismo de ação do tembotrione. Como tembotrione não afeta diretamente na síntese de clorofila (XU et al., 2019) e as folhas utilizadas na coleta apresentavam o aparato fotossintético estabelecido, a redução no conteúdo de clorofila, se deve a degradação decorrente da inibição da HPPD. A redução do *pool* de plastoquinona causada pelo herbicida, bem como a redução na síntese de pigmentos fotoprotetores acarreta no acúmulo de energia no FSII, comprometendo a dissipação de energia e EROs, levando a fotodegradação das clorofilas (NORRIS et al., 1995; LOHR et al., 2005; KSAS et al., 2018).

A clorofila e os carotenoides desempenham papéis importantes na função do aparato fotossintético, incluindo o controle sobre a energia de excitação, controle da função fotossintética e biogênese de membranas fotossintéticas, bem como, na regulação de processos celulares (ANDERSON; ROBERTSON, 1960). As moléculas de clorofila e carotenoides se ligam a proteínas integrantes da maquinaria fotossintética, onde absorvem energia da luz para gerar energia de ligação química (na forma de açúcares) e também atuam no gerenciamento da utilização da energia de excitação (LOHR et al., 2005).

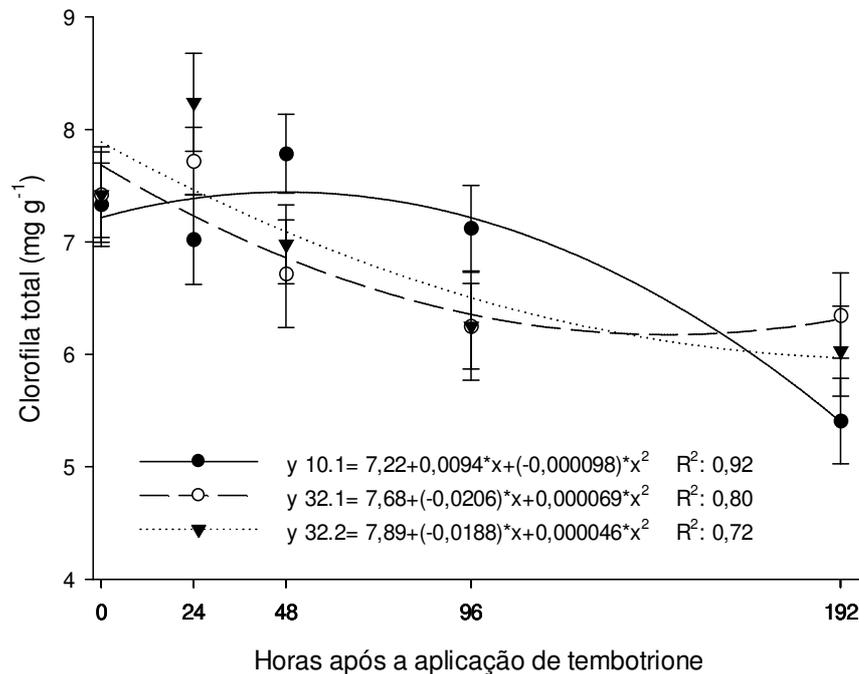


Figura 34- Clorofila total de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

O conteúdo total de carotenoides diminuiu significativamente com o decorrer dos períodos de avaliação, com forte decréscimo para o biótipo suscetível (Figura 35). Os carotenoides reduziram em 42,6%, 12,7% e 16,5%, respectivamente para os biótipos 10.1, 31.1 e 32.2 do tempo 0 h até as 192 h após a aplicação de tembotrione. A maior redução de carotenoides no biótipo suscetível pode ter comprometido as reações redox (FRANK; BRUDVIG, 2004), e proteção contra a fotodegradação pela eliminação de oxigênio singleto e espécies reativas de clorofila no estado tripleto (BAROLI et al., 2003; FRANK; BRUDVIG, 2004). Além de comprometer a dissipação do excesso de energia da luz absorvida por meio de interações com moléculas de clorofila excitadas no estado singleto (POGSON; RISSLER, 2000; MA et al., 2003).

A redução no conteúdo de clorofila e carotenoides, especialmente no biótipo 10.1 foi concomitante com o incremento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figuras 34, 35 e 36). TBARs apresentou incremento de 284,9% no biótipo suscetível, enquanto para os biótipos resistentes 31.1 e 32.2 o incremento foi de 35,1% e 42,42%, respectivamente, quando comparado os valores observados no tempo 0 h contra as 192 h após a aplicação de tembotrione (Figura 36).

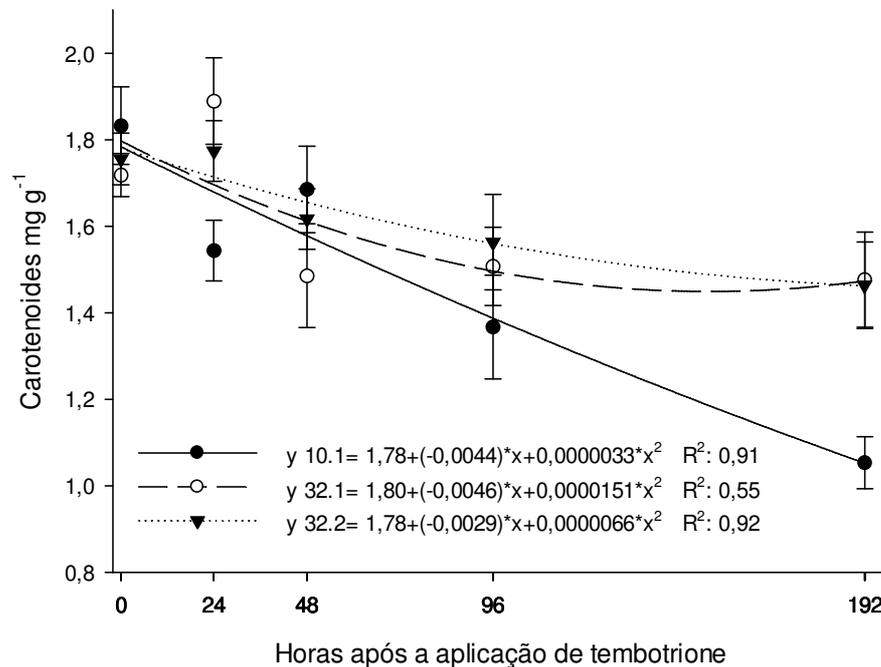


Figura 35- Carotenoides de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

A peroxidação lipídica pode ser avaliada monitorando a formação de TBARS, que é um produto da decomposição de ácidos graxos poli-insaturados, que são os principais componentes dos lipídeos da membrana (LEE et al., 2007). O malondialdeído (MDA) e outros produtos formados pela decomposição dos produtos da peroxidação lipídica reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Assim, TBARS é um indicador confiável da geração de radicais livres celulares e do estresse oxidativo, por mensurar o dano oxidativo causado em lipídeos de membrana (SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004).

Com o decorrer do período após a aplicação de tembotrione foi possível observar que o dano oxidativo no biótipo suscetível foi superior em cerca de 2,4 vezes em comparação aos biótipos resistentes no último período de avaliação (Figura 36). Diversos trabalhos demonstram que o incremento de TBARS está correlacionada com a geração de EROs, como consequência de uma série de estresses abióticos, incluindo a aplicação de herbicidas (BALALESTRASSE et al., 2006; LEE et al., 2007; SONG et al., 2007; ALI et al., 2021).

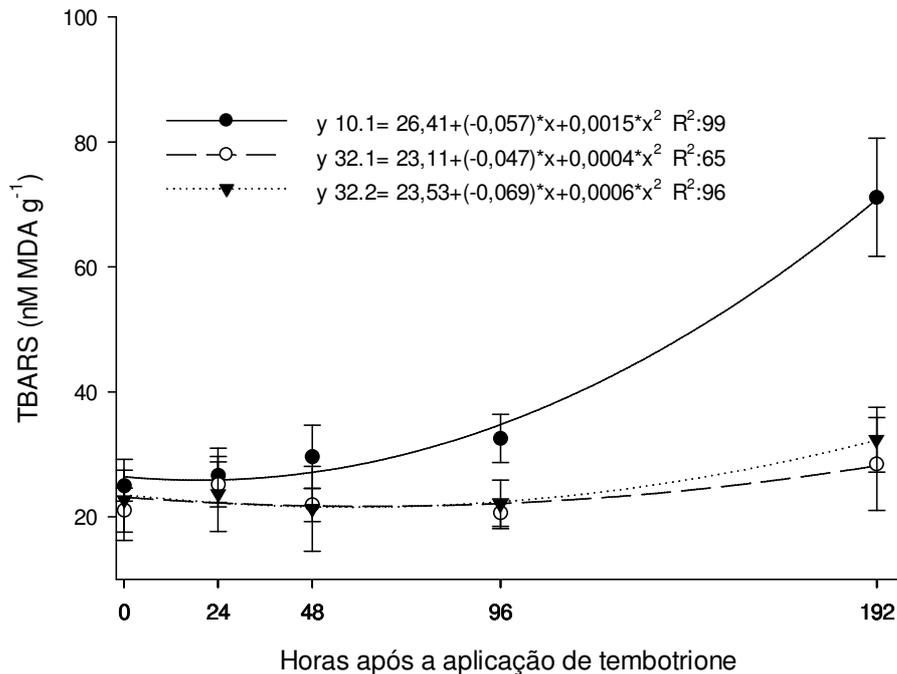


Figura 36- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permaneceram estáveis nos biótipos resistentes durante todo o período de exposição ao herbicida tembotrione, variando entre 160-280 μM (Figura 37). Por outro lado, o biótipo suscetível demonstrou considerável incremento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir das 96 horas de exposição ao herbicida, sendo que as 192 h o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou cerca de 4 vezes em comparação aos biótipos resistentes. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serve como indicador de estresse oxidativo, uma vez que níveis muito elevados, indicam a sobrecarga do sistema antioxidante da planta. Por outro lado, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um importante sinalizador celular, mediando informações com o núcleo para expressão de genes em resposta a diversos tipos estresses (CERNÝ et al., 2018).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser produzido de diversas formas no metabolismo vegetal (BARBOSA et al., 2014). A fotorrespiração é a principal fonte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células fotossintéticas, correspondendo a cerca de 60-70% do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido, seguido pela cadeia de transporte de elétrons fotossintética em plantas (PAN et al., 2017; FOYER; SHIGEOKA, 2011). Nas mitocôndrias, cloroplastos e citosol, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é gerado a partir da dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> pela SOD (FOYER; SHIGEOKA, 2011). A β-oxidação de ácidos

graxos nos glioxissomos também gera  $H_2O_2$ . Na membrana plasmática, o  $H_2O_2$  é formado pela ação da NADPH oxidase (Rboh) e, na matriz extracelular, várias enzimas também são fonte de  $H_2O_2$  (MYLONA; POLIDOROS, 2010).

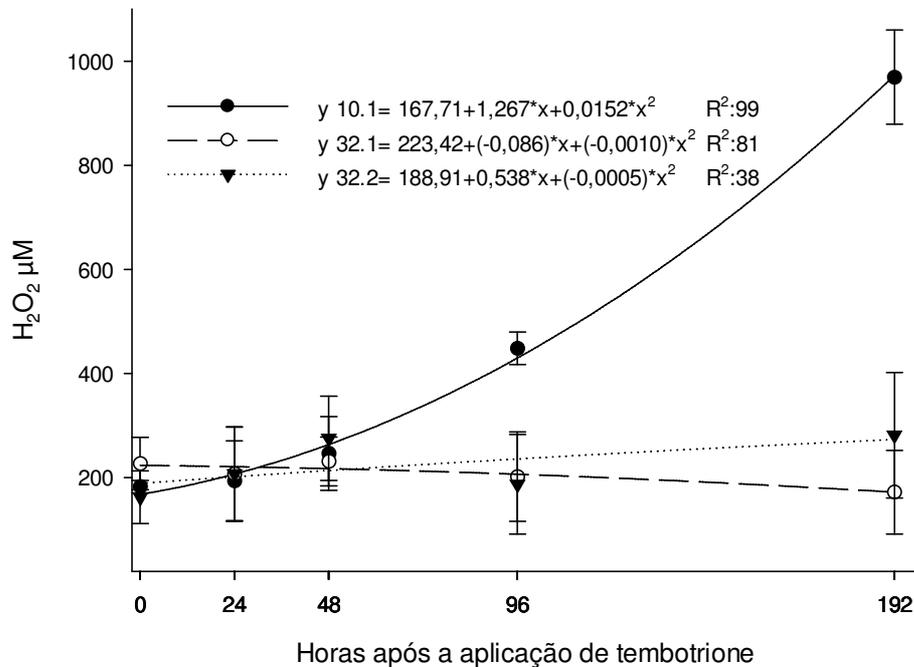


Figura 37- Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione ( $100,8 \text{ g ha}^{-1}$ ). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Devido os diversos locais em que o  $H_2O_2$  pode ser gerado é difícil prever com precisão em quais compartimentos celulares é produzido (FOYER; SHIGEOKA, 2011). Como os inibidores da HPPD afetam a captação de energia nas antenas dos FSII e FSI e no transporte de elétrons, via disrupção da síntese de pigmentos fotoprotetores e plastoquinona, respectivamente, é provável que grande parte do  $H_2O_2$  no biótipo suscetível seja proveniente da interrupção da cadeia de transporte de elétrons. Além disso, o  $H_2O_2$  é um potente inibidor da fotossíntese, pois tem a capacidade de oxidação de enzimas com grupamentos tiol que modulam o ciclo de Calvin (BARBOSA et al., 2014). Esse fato explica a paralisação completa da fotossíntese no biótipo suscetível, que coincidiu com o incremento de  $H_2O_2$  a partir das 96 horas após a aplicação de tembotrione.

O incremento de TBARs e  $H_2O_2$  especialmente no biótipo suscetível, a partir de 96 horas após a aplicação de tembotrione, também coincidiu com o maior extravasamento celular (Figuras 36,37 e 38). Os valores de extravasamento celular

no biótipo suscetível foram 45,8% e 36,0% superiores, em comparação aos biótipos 32.1 e 32.2, respectivamente, para a avaliação realizada às 192 h após exposição ao tembotrione (Figura 38).

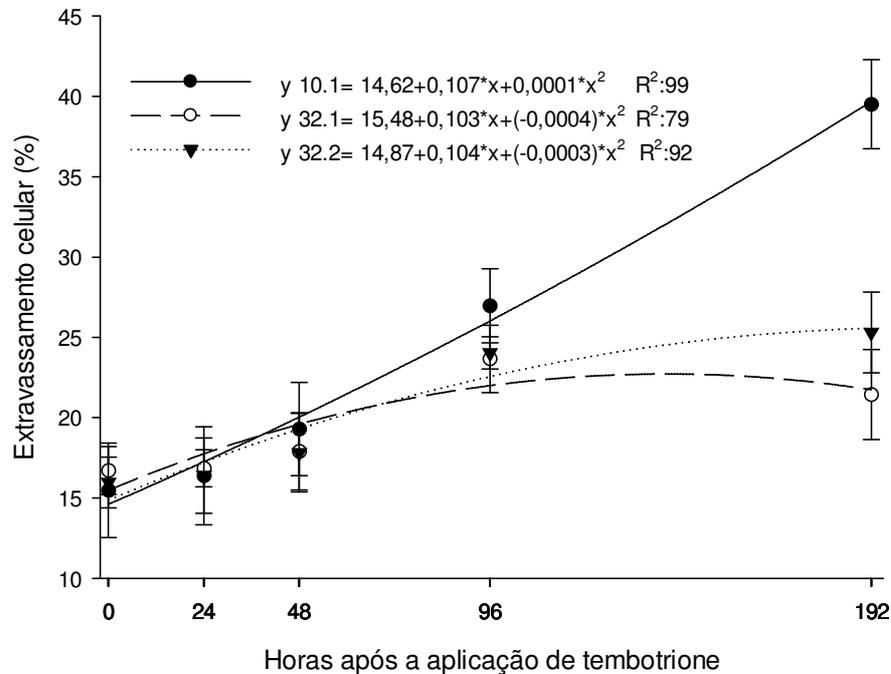


Figura 38- Extravasamento celular de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

O extravasamento celular é um indicador da integridade estrutural de membranas, pois a solução que recebe este extravasamento terá sua condutividade eletrolítica aumentada, pela presença dos íons e compostos polares presentes no citosol. Isso indica que as membranas foram danificadas pela peroxidação lipídica causando o extravasamento do conteúdo celular para o meio (KRUSE et al., 2006). Danos mais leves podem comprometer a funcionalidade de parte de um tecido vegetal, enquanto danos mais severos podem comprometer diversos processos fisiológicos e metabólicos das plantas, levando a planta à morte (KRUSE et al., 2006).

#### 4.3.4 Atividade de enzimas antioxidantes

A análise de variância demonstrou interação entre os fatores biótipos e tempo após a aplicação de tembotrione, para a atividade das enzimas SOD, CAT e APX. Os dados obtidos da atividade das enzimas CAT e APX se ajustaram ao modelo de

distribuição de Gauss de três parâmetros, exceto para o biótipo 10.1 na atividade da APX e o 32.2 na atividade da CAT. A atividade da SOD, de maneira geral, demonstrou incremento nas primeiras 48 horas após a aplicação, com posterior decréscimo às 96 h, e novamente acréscimo 192h (Figura 39). Porém, não foram observadas diferenças expressivas na atividade da SOD entre os biótipos resistentes e suscetível, que justificassem o menor nível de  $H_2O_2$  e danos celulares observados nos biótipos resistentes.

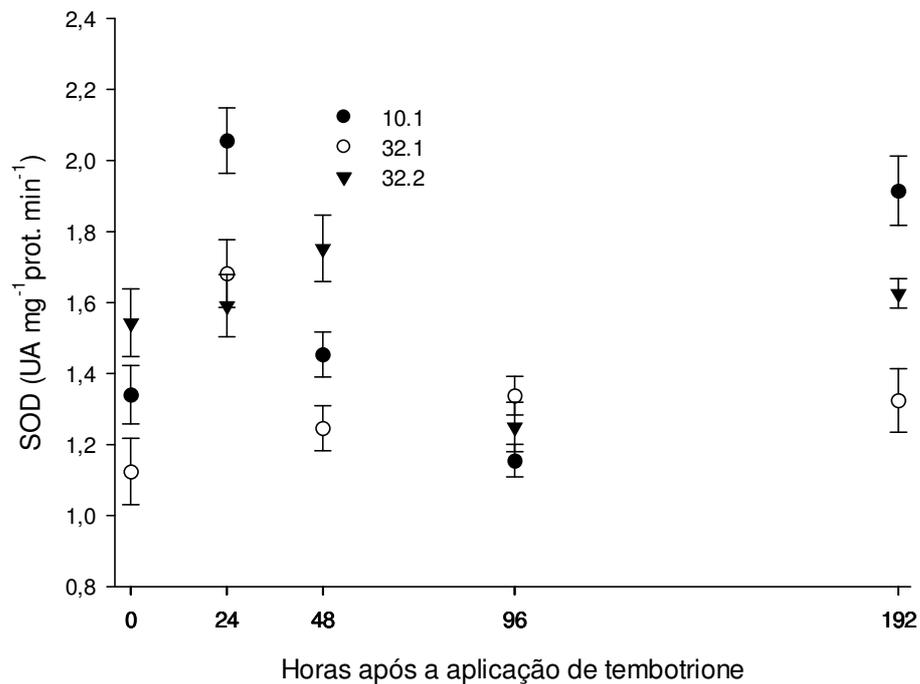


Figura 39- Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. UA= unidade ativa.

As SODs são metalo-enzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as EROs e que catalisam a dismutação de dois radicais  $O_2^{\cdot-}$ , gerando  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Essas enzimas participam da modulação do nível de  $H_2O_2$  em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002). O balanço entre a atividades da SOD, peroxidases e CAT é crucial para alcançar níveis basais de radicais  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ . Este balanço, juntamente com o sequestro de íons metálicos, previne a formação de  $OH^{\cdot}$  nas reações de Haber-Weiss e Fenton (VAN BREUSEGEM et al., 2001; MITTLER, 2002).

Para a enzima APX, verificou-se que a atividade basal do biótipo suscetível foi superior aos biótipos resistentes (Figura 40). No entanto, às 48 horas após a aplicação de tembotrione, quando a inibição da HPPD começou a demonstrar seus efeitos fitotóxicos todos os biótipos apresentaram atividade similar. A partir das 48 h os biótipos resistentes apresentaram incremento da atividade da APX em aproximadamente 2 vezes em comparação ao biótipo suscetível. Já às 192 h após a exposição, o biótipo 32.2 permaneceu com a atividade mais elevada que o suscetível (10.1), no entanto o biótipo 32.1 demonstrou atividade da APX, similar ao biótipo suscetível.

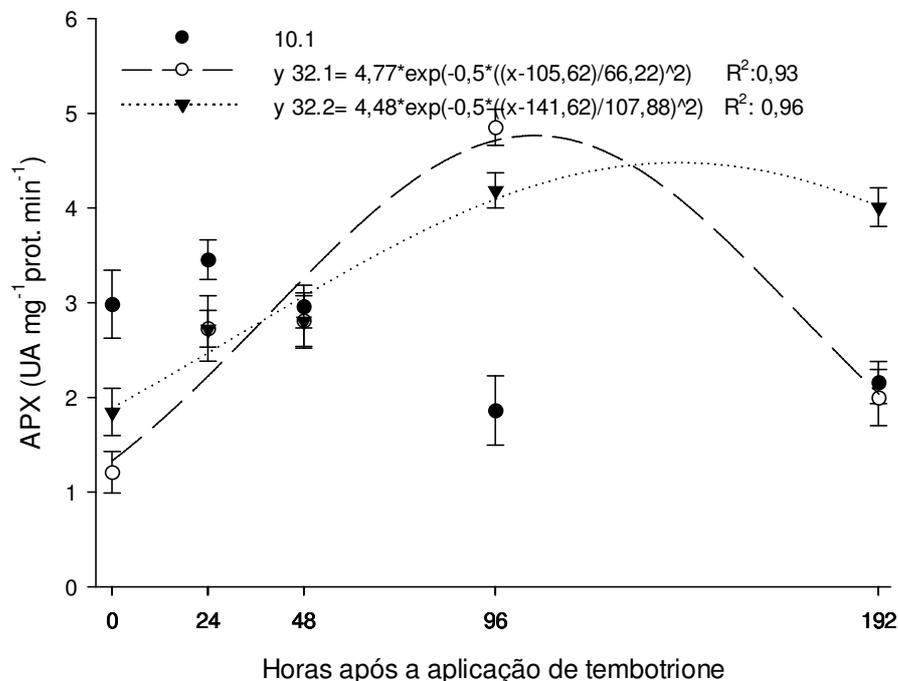


Figura 40- Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância. UA= unidade ativa.

A APX pertence à família das peroxidases contendo heme, que catalisam a oxidação dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. APX difere de outras peroxidases devido a dependência de ascorbato como fonte de poder redutor (PANDEY et al., 2017). As plantas apresentam diferentes formas e compartimentos em que a APX é localizada, no caso do arroz são 8 isoenzimas (OsAPX1-OsAPX8), sendo duas APX para cada compartimento celular (citosol, peroxissomo, cloroplasto e mitocôndria) (JARDIM-MESSEDER et al., 2018). No caso de herbicidas que afetam a fotossíntese, a

atividade da isoforma presente nos tilacóides é de fundamental importância para minimizar a produção de EROS e os danos celulares, incluindo aqueles relacionados ao aparato fotossintético (JARDIM-MESSEDER et al., 2018).

A maior atividade da APX nos biótipos resistentes a partir das 48 h após a aplicação de tembotrione pode ter contribuído para manter o  $H_2O_2$  abaixo dos níveis em que a planta perde a homeostase celular, limitando o estresse oxidativo, danos irreversíveis a membranas e morte celular. Uma série de trabalhos relatam a importância do incremento da atividade da APX como forma de aliviar o dano oxidativo, em função de estresses bióticos e abióticos, incluindo aqueles causados por herbicidas (JUNG et al., 2008; PANDEY et al., 2017; JARDIM-MESSEDER et al., 2018).

A atividade da CAT também foi alterada em função da exposição ao herbicida tembotrione nos biótipos de leiteira (Figura 41). O biótipo suscetível reduziu a atividade da CAT no decorrer dos períodos de avaliação, enquanto o biótipo resistente 32.1 aumentou a atividade nas primeiras 96 horas com posterior redução da atividade as 192 horas. Por outro lado, o biótipo 32.2 manteve a atividade da CAT entre 0,03 e 0,06 UA durante todo o período de avaliação. De maneira geral, a atividade da CAT, demonstrou redução da atividade ou até mesmo, variação dentro da normalidade, apesar do elevado nível de  $H_2O_2$ , especialmente no biótipo suscetível. A CAT, é uma enzima envolvida no metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa em peroxissomos, que transforma  $H_2O_2$  em água e oxigênio (PEIXOTO et al., 2008). A localização em um compartimento celular, o qual não está envolvido diretamente com a cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto, pode explicar a resposta diferencial da CAT em comparação a APX, na eliminação de  $H_2O_2$ , nos biótipos resistentes (32.1 e 32.2).

Os resultados aqui apresentados mostram que o estresse resultante da aplicação do herbicida leva a maiores níveis de EROs no biótipo suscetível e a resposta do sistema antioxidante, especialmente da enzima catalase, contribui para o menor dano celular nos biótipos resistentes. Assim, a atividade antioxidante pode contribuir para o menor controle de biótipos resistentes a HPPD de *Euphorbia heterophylla*.

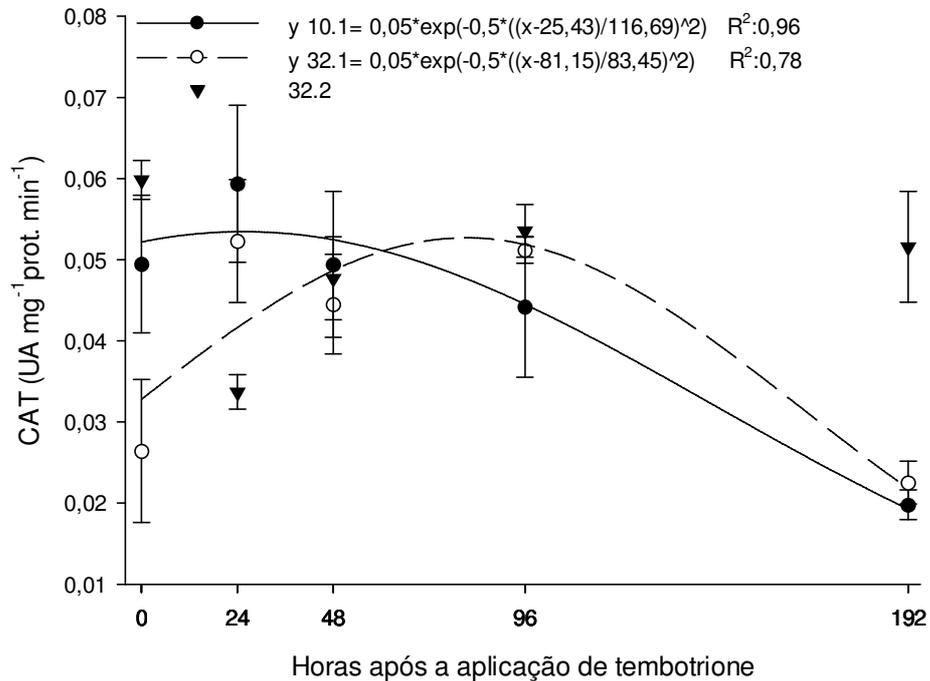


Figura 41- Atividade da enzima catalase (CAT) de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) aos inibidores da HPPD, em diferentes períodos após a aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup>). Capão do Leão, RS, 2021. As barras verticais representam o intervalo de confiança ao nível de 95% de significância. UA= unidade ativa.

#### 4.4 Conclusões

O incremento do período de exposição ao tembotrione do biótipo suscetível aos inibidores da HPPD resulta em rápido aumento da F0 e redução acentuada de Fm e Fv/Fm, em comparação aos biótipos resistentes.

Os biótipos resistentes aos inibidores da HPPD demonstram menor declínio das variáveis fotossintéticas (A, Gs, E, CE e EUA), além de, menor incremento da Ci, em relação ao biótipo suscetível, no decorrer do período de exposição ao herbicida tembotrione.

O incremento do período de exposição ao herbicida tembotrione acarretou no aumento significativo de estresse oxidativo no biótipo suscetível em comparação aos resistentes, evidenciado pelo aumento de TBARs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, extravasamento celular e menor conteúdo de carotenoides.

A maior atividade da APX 96 horas após a aplicação de tembotrione, nos biótipos resistentes acarretou em menores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menores danos aos componentes celulares.

## **5. Capítulo IV – Herança da resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da HPPD.**

### **5.1 Introdução**

A resistência aos herbicidas inibidores da HPPD em biótipos de *E. heterophylla* é de grande preocupação, visto que esta classe de herbicidas, representa uma das mais recentes e importantes introduções de um novo mecanismo de ação no mercado mundial. A partir do primeiro herbicida lançado comercialmente no final dos anos 80 nos Estados Unidos (OLIVEIRA et al., 2018), uma série de novas moléculas herbicidas que apresentam como alvo a inibição da HPPD, vem sendo descobertas nos últimos anos (FU et al., 2019; FU et al., 2021; WANG et al., 2020). Além disso, esses herbicidas apresentam uso potencial para eventos de transgenia em diversas culturas, através de mutações induzidas no gene HPPD. Portanto, práticas são necessárias para retardar e minimizar a evolução da resistência a este grupo de herbicidas, para manutenção da eficiência agrônômica, frente aos crescentes casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas.

Estudos que visam entender a dinâmica eco-evolutiva que causa a evolução das plantas daninhas a resistência a herbicidas, são importantes para direcionar estratégias de manejo para minimizar o potencial impacto da resistência (NEVE et al., 2014). Por exemplo, estudos de herança podem melhorar o entendimento da estrutura genética de populações de plantas daninhas sob seleção de herbicida e ajudar a criar modelos de simulação da dispersão da resistência (NEVE et al., 2014; RENTON et al., 2014; MENALLED et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018).

Vários fatores, como a frequência inicial de alelos que conferem resistência, custo adaptativo, fluxo gênico, pressão de seleção e o padrão de herança influenciam a disseminação e a dinâmica de indivíduos resistentes a herbicidas na população de plantas daninhas (GHANIZADEH et al., 2019). Desses fatores, o padrão de herança

desempenha um papel particularmente importante no sucesso das características de resistência a herbicidas a serem transmitidas às gerações sucessivas (NEVE et al., 2014).

Em plantas daninhas, os genes de resistência a herbicidas podem ser transmitidos para a próxima geração via pólen e óvulo (JASIENIUK et al., 1996). A herança de genes nucleares pode ocorrer via pólen e óvulo, enquanto no caso de herança citoplasmática (ou plastídica), o(s) alelo(s) de resistência somente podem ser transmitidos através do óvulo para a próxima geração (JASIENIUK et al., 1996). Por outro lado, dependendo do mecanismo de resistência (relacionado ao local de ação e não relacionado ao local de ação), diferentes padrões de herança têm sido documentados em espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas estudadas até o momento.

Para resistência a HPPD em *A. tuberculatus*, que possui como mecanismo de resistência o metabolismo acelerado do herbicida, foi observado que este tipo de resistência é coordenado por vários genes com diferentes graus de dominância (HUFFMAN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018; KOHLHASE et al., 2018). Na população de *A. tuberculatus* em Illinois foi considerada incompletamente recessiva (HUFFMAN et al., 2015), enquanto a população de Nebraska mostrou padrões variados de herança da resistência, desde incompletamente recessivo a semidominante (OLIVEIRA et al., 2018). Por outro lado, a população de Iowa demonstrou que pelo menos um alelo de resistência dominante nos loci participantes é necessário para promover a resistência à mesotrione (KOHLHASE et al., 2018).

A herança de alelos que contribuem para a resistência a herbicidas pode variar a partir de diferentes origens genéticas, bem como com a interferência do ambiente e da dose do herbicida empregada para o manejo das populações de plantas daninhas (NEVE et al., 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o modo de herança, o tipo de dominância e o grau de resistência da geração F1 em plantas de leiteira que apresentam como mecanismo de resistência o rápido metabolismo do herbicida tembotrione.

## 5.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao CEHERB/UFPEL. Inicialmente, foi realizada a autopolinização de 5 plantas de *Euphorbia heterophylla* para cada biótipo resistente (32.1 e 32.2) aos inibidores da HPPD e de 5 plantas do biótipo suscetível (10.1) para obter os genitores homozigotos resistentes e homozigotos suscetíveis. Para realizar a autopolinização e evitar a contaminação com pólen externo, cada planta foi disposta em uma única câmara de crescimento.

As sementes provenientes de cada autopolinização foram coletadas separadamente e armazenadas na temperatura de 5°C para conservar a qualidade fisiológica. Posteriormente foram semeadas 30 sementes em uma única bandeja de cada planta suscetível e resistente autopolinizada. Quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas, foi pulverizado o herbicida tembotrione na dose de 100,8 g ha<sup>-1</sup> e óleo metilado de soja na concentração de 0,5% v/v, com equipamento costal pressurizado com CO<sub>2</sub>. Todos os genitores nos quais ocorreu a morte de todas as plantas foram considerados homozigotos suscetíveis. Do mesmo modo, foram considerados homozigotos resistentes aqueles em que todas as plantas sobreviveram à aplicação do herbicida.

Para a realização dos cruzamentos, foi escolhido um genitor homozigoto resistente para cada biótipo (32.1 e 32.2) e um homozigoto suscetível (10.1). As sementes de cada genitor foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato, sendo transferidas na fase de plântula para vasos plásticos com 4 kg de solo preenchidos com Argissolo Vermelho-Amarelo de textura franco-arenosa, pertencente à unidade de mapeamento de Pelotas-RS (EMBRAPA, 2013). Após a emergência das plantas, foi realizado o procedimento de desbaste, mantendo apenas uma planta por vaso. Durante o ano agrícola 2019/20 foram realizados os cruzamentos entre os genitores suscetíveis e resistentes para obtenção de sementes F1. Na safra 2020/21 foram realizados os retrocruzamentos entre plantas F1 e seus respectivos genitores masculinos e femininos resistentes (RCr) e suscetíveis (RCs), bem como, a obtenção da linhagem F2, através da autofecundação de plantas F1. Para realização dos cruzamentos e retrocruzamentos foram retirados diariamente os androceus da planta fêmea, para evitar a autofecundação e polinizadas com o pólen do genitor desejado (resistente ou suscetível). As sementes provenientes destes cruzamentos foram coletadas e armazenadas.

Na safra 2021/2022 as sementes F1, F2, RCr e RCs e dos genitores resistentes e suscetíveis foram semeadas em bandejas de isopor e transferidas na fase de plântula para bandejas de plástico com solo, sendo aplicado o herbicida tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup> + óleo metilado de soja 0,5% v/v) quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas. Após a aplicação do herbicida foi avaliado o número de plantas sobreviventes das gerações F1 e F2, dos retrocruzamentos (RCr e RCs), bem como dos genitores resistentes e suscetível. A partir dos dados obtidos foram analisadas as frequências de suscetibilidade ou resistência, comparando as frequências observadas com a esperada (segregação mendeliana em que o gene responsável pela característica é nuclear de dominância completa), através do teste de hipóteses de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $p \leq 0,05$ ).

Além disso, foram semeadas em bandejas de isopor e transplantadas para vasos de 700 cm<sup>3</sup>, plântulas dos genitores resistentes (32.1 e 32.2) e suscetível (10.1) e das gerações F1. Quando as plantas de leiteira atingiram o estágio de 4 folhas foram tratadas com doses crescentes de tembotrione (0; 50,4; 100,8 e 201,6 g ha<sup>-1</sup>), sendo a dose de 100,8 g ha<sup>-1</sup> registrada para o controle de leiteira. As variáveis avaliadas foram eficiência de controle e redução da MSPA aos 30 dias após a aplicação do herbicida, seguindo a mesma metodologia de avaliação descrita no capítulo 1. Os dados obtidos foram analisados quanto à homocedasticidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Quando significativas, as doses e os genótipos foram comparados pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.3 Resultados e Discussão

Os genitores resistentes 32.1 e 32.2 (R) e suscetível 10.1 (S) confirmaram sua resistência e sensibilidade ao herbicida tembotrione, onde todas as plantas testadas sobreviveram ou morreram, respectivamente, após a exposição ao herbicida (Tabela 10 e 11). Para as F2 e os RCs dos cruzamentos R♂ x S♀ envolvendo os dois biótipos resistentes (32.1 e 32.2) foram aceitas as hipóteses de igualdade entre os números observados e esperados, ou seja, os desvios obtidos não foram significativos (Tabela 10 e 11). Por outro lado, não foram aceitas as hipóteses de igualdade para as F2 e os RCs dos cruzamentos S♂ x R♀ para os dois biótipos resistentes (32.1 e 32.2) (Tabela 10 e 11).

Tabela 10- Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de leiteira suscetíveis (10.1) e resistentes (32.1) ao herbicida tembotrione. Capão do Leão, RS, 2022.

Cruzamento	Nº de plantas	R	S	Frequência		$\chi^2$ *	Probabilidade#
				Esperada	Observada		
S (10.1)	19	-	19	-	-	-	-
R (32.1)	30	30	-	-	-	-	-
$R_{\text{♂}} \times S_{\text{♀}}$							
F1	16	7	9	1:0	0,5:0,64	-	-
F2	89	65	24	3:1	2,70:1	0,18	66,8
RCr	85	57	28	1:0	1,12:0,55	-	-
RCs	115	63	52	1:1	1,21:1	1,05	30,5
$S_{\text{♂}} \times R_{\text{♀}}$							
F1	62	56	6	1:0	0,8:0,09	-	-
F2	119	117	2	3:1	58,5:1	33,65	0,0
RCr	114	108	6	1:0	0,9:0,05	-	-
RCs	118	109	9	1:1	12,1:1	84,7	0,0

\* Qui-quadrado calculado — fornece a probabilidade de as diferenças entre a frequência esperada e a observada serem devidas ao acaso ( $p \leq 0,05$ ). Graus de liberdade = 1. # Obtida através do software Genes quando  $\chi^2$  possuem distribuição normal ( $p \leq 0,05$ ).

No primeiro cruzamento simples ( $R_{\text{♂}} \times S_{\text{♀}}$ ), para ambos biótipos resistentes (32.1 e 32.2) (Tabela 10 e 11) a F1 apresentou-se parcialmente resistente, evidenciando que o genitor masculino transmitiu a característica de resistência para a prole, porém os valores de segregação esperados de 1:0 (resistente: suscetível), foram muito aquém dos observados, de 0,5:0,64 e 0,50:0,56, nos cruzamentos envolvendo os genitores resistentes 32.1 e 32.2, respectivamente. Esses resultados indicam que a resistência é controlada por genes de herança nuclear, e o movimento de pólen pode ser responsável pela transferência de alelos de resistência ao herbicida (BUSI et al., 2011).

A geração F2 apresentou segregação resistente/suscetível de 2,7:1 e 4,7:1, com teste  $\chi^2$  fornecendo probabilidade de 66,8% e 19,3% de ser de 3:1, respectivamente, para os cruzamentos com os genitores resistentes 32.1 e 32.2. Os RCr demonstraram segregação 1,12:0,55 e 1,02:0,83, respectivamente, nos cruzamentos dos genitores 32.1 e 32.2, quando o esperado era ser 1:1. Já os RCs envolvendo os genitores 32.1 e 32.2, apresentaram respectivamente, segregação resistente/suscetível de 1,21:1 e 1,30:1, quando o esperado era 1:1, com probabilidade de 30,5% e 20,5% de ser de 1:1.

No segundo cruzamento simples ( $S_{\text{♂}} \times R_{\text{♀}}$ ), a geração F1, assim como no primeiro cruzamento, mostrou-se parcialmente resistente, com segregação para os cruzamentos envolvendo os biótipos 32.1 e 32.2 de 0,8:0,09 e 0,71:0,30,

respectivamente, indicando que a resistência também é transmitida hereditariamente pelo genitor feminino e, novamente, apresentando como característica a dominância incompleta. A F2 apresentou segregação resistente/suscetível de 58,5:1 e 21,6:1, para os biótipos 32.1 e 32.2, respectivamente, com probabilidade nula de ser 3:1.

Na segregação dos RCr foram testadas 114 e 98 plantas, das quais 108 e 88 se mostraram resistentes para o herbicida tembotrione, respectivamente, para os genitores 32.1 e 32.2, enquanto a segregação esperada era que 100% da prole apresentasse como resistente ao herbicida. No RCs a segregação observada para os cruzamentos envolvendo os genitores 32.1 e 32.2 foi de 12,1:1 e 7,2:1, respectivamente, enquanto a esperada era de 1:1, com probabilidade de 0% de ser igual a esperada.

Tabela 11- Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de leiteira suscetíveis (10.1) e resistentes (32.2) ao herbicida tembotrione. Capão do Leão, RS, 2022.

Cruzamento	Nº de plantas	R	S	Frequência		$\chi^2$ *	Probabilidade#
				Esperada	Observada		
S (10.1)	19	-	19	-	-	-	-
R (32.2)	32	32	-	-	-	-	-
R♂ x S♀							
F1	38	18	20	1:0	0,50:0,56	-	-
F2	57	47	10	3:1	4,7:1	1,69	19,3
RCr	85	47	38	1:0	1,02:0,83	-	-
RCs	90	51	39	1:1	1,30:1	1,6	20,5
S♂ x R♀							
F1	37	26	11	1:0	0,71:0,30	-	-
F2	113	108	5	3:1	21,6:1	25,5	0,0
RCr	98	88	10	1:0	0,79:0,09	-	-
RCs	90	79	11	1:1	7,2:1	51,3	0,0

\* Qui-quadrado calculado — fornece a probabilidade de as diferenças entre a frequência esperada e a observada serem devidas ao acaso ( $p \leq 0,05$ ). Graus de liberdade = 1. # Obtida através do software Genes quando  $\chi^2$  possuem distribuição normal ( $p \leq 0,05$ ).

As frequências observadas não demonstraram igualdade para a maioria dos cruzamentos, contra as frequências esperadas, usando como base o modelo de segregação quando a herança é nuclear de dominância completa, isso indica que a resistência de tembotrione em plantas de leiteira é complexa, provavelmente envolvendo múltiplos genes que apresentam diferentes níveis de dominância. Resultados similares foram observados para a herança da resistência de *Amaranthus tuberculatus* para o herbicida mesotrione, em que a transferência dos genes que conferem a resistência para a geração F1 foi parcial, sendo observada segregação

resistente/suscetível de 1:3,84; quando o herbicida foi pulverizado na dose de 105 g ha<sup>-1</sup> (KOHLHASE et al., 2018).

Em *A. tuberculatus*, assim como em leiteira, a resistência envolve o rápido metabolismo dos herbicidas inibidores da HPPD, sendo essa característica poligênica, com graus variados de dominância com base nos estudos realizados para elucidar a herança da resistência a essa classe de herbicidas (HUFFMAN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018; KOHLHASE et al., 2018). Biótipos de *A. tuberculatus* de Illinois foram considerados incompletamente recessivos (HUFFMAN et al., 2015), enquanto biótipos de Nebraska mostraram padrões variando de incompletamente recessivos a semi-dominante (OLIVEIRA et al., 2018). Além disso, foi verificado que pelo menos um alelo dominante nos loci participantes é necessário para conferir a resistência ao herbicida mesotrione (KOHLHASE et al., 2018).

Para testar a dominância, plantas heterozigotas F1 e os genitores resistentes e suscetível foram tratadas com doses crescentes de tembotrione (Tabela 12). Houve efeito significativo da interação entre doses do herbicida tembotrione e os genitores biótipo suscetível (10.1), os dois resistentes (32.1 e 32.2) e as gerações F1, para as variáveis controle e redução da MSPA ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 12). Os resultados evidenciam que as plantas heterozigotas R♂ x S♀ apresentam grau de resistência inferior às S♂ x R♀, pois em doses intermediárias (50,4 e 100,8 g ha<sup>-1</sup>) o controle e redução da MSPA das plantas heterozigotas R♂ x S♀ é superior independentemente do genitor resistente (32.1 e 32.2) utilizado. Por outro lado, o heterozigoto R♂ x S♀ demonstrou ser mais tolerante que o biótipo suscetível, enquanto o heterozigoto S♂ x R♀ apresentou menor nível de resistência que os progenitores resistentes (32.1 e 32.2).

Esses resultados indicam que a transferência dos genes que conferem o rápido metabolismo de tembotrione do biótipo resistente para o suscetível via pólen, origina um heterozigoto com nível de resistência bem inferior as observadas no genitor masculino. Por outro lado, a transferência de pólen do biótipo suscetível para o resistente, acarreta em um heterozigoto com nível de resistência inferior ao genitor resistente, mas superior a prole R♂ x S♀.

Tabela 12- Controle aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) e massa seca da parte aérea (MSPA) em função da aplicação de doses crescentes de tembotrione em biótipos de leiteira suscetível (S), Heterozigoto F1 (Het) e resistentes (R). Capão do Leão, RS, 2022.

Tembotrione g ha <sup>-1</sup>	10.1 (S)	Het R <sup>♂</sup> x S <sup>♀</sup>	Het S <sup>♂</sup> x R <sup>♀</sup>	32.1 (R)
Controle 30 DAT (%)				
0	0,0 <sup>ns</sup> C	0,0 C	0,0 C	0,0 C
50,4	88,5 aB	43,3 bB	23,2 bB	6,3 bC
100,8	100,0 aA	92,6 aA	32,7 bB	27,5 bB
201,6	100,0 aA	96,6 aA	90,0 aA	38,0 bA
CV(%)	27,0			
Tembotrione g ha <sup>-1</sup>	10.1 (S)	Het R <sup>♂</sup> x S <sup>♀</sup>	Het S <sup>♂</sup> x R <sup>♀</sup>	32.2 (R)
Controle 30 DAT (%)				
0	0,0 <sup>ns</sup> C	0,0 C	0,0 C	0,0 D
50,4	88,5 aB	22,3 bC	15,0 bcC	5,0 cC
100,8	100,0 aA	70,0 bB	44,2 bcB	21,0 cB
201,6	100,0 aA	100,0 aA	84,5 abA	61,0 bA
CV(%)	29,2			
Tembotrione g ha <sup>-1</sup>	10.1 (S)	Het R <sup>♂</sup> x S <sup>♀</sup>	Het S <sup>♂</sup> x R <sup>♀</sup>	32.1 (R)
Redução da MSPA 30 DAT (%)				
0	0,0 <sup>ns</sup> C	0,0 C	0,0 D	0,0 B
50,4	95,8 aB	54,8 bB	23,1 cC	9,5 dB
100,8	99,2 aA	86,4 bA	67,6 cB	59,3 cA
201,6	98,6 aA	92,0 abA	85,9 bA	65,7 cA
CV(%)	11,62			
Tembotrione g ha <sup>-1</sup>	10.1 (S)	Het R <sup>♂</sup> x S <sup>♀</sup>	Het S <sup>♂</sup> x R <sup>♀</sup>	32.2 (R)
Redução da MSPA 30 DAT (%)				
0	0,0 <sup>ns</sup> C	0,0 D	0,0 D	0,0 C
50,4	95,8 aB	43,6 bC	26,9 cC	7,7 dC
100,8	99,2 aA	80,5 bB	64,2 cB	27,3 dB
201,6	98,5 aA	95,6 aA	85,3 bA	72,6 cA
CV(%)	11,95			

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

A variabilidade observada nos cruzamentos controlados de leiteira demonstra que a resistência parece não ser controlada por um único gene principal, em virtude do padrão de segregação na geração F2 e dos retrocruzamentos. Além disso, a análise de controle e redução da MSPA das gerações F1 mostraram comportamento intermediários aos genitores, demonstrando redução do nível de resistência com o aumento de doses do herbicida, sendo esse tipo de resposta característico de respostas quantitativas (poligênicas) (HUFFMAN et al., 2015). O controle de plantas F1 foi maior que o genitor suscetível em doses mais baixas e menor que o resistente em doses mais altas (Tabela 12), sugerindo que a herança de alelos de resistência à tembotrione é aditiva (TABASHNIK, 1991).

A sensibilidade intermediária dos genótipos heterozigotos tem implicações práticas importantes, já que, em lavouras infestadas com essas plantas, o aumento da dose de tembotrione acarreta no aumento do controle. No entanto, somente os biótipos heterozigotos e suscetíveis serão controlados, resultando em maior espaço para crescimento e multiplicação dos biótipos resistentes, que poderão ocupar o banco de sementes e garantir a infestação dos cultivos em sucessão.

#### **5.4 Conclusões**

A herança da resistência de leiteira ao herbicida tembotrione é complexa, sendo codificada por genes nucleares de dominância incompleta.

Os heterozigotos possuem sensibilidade intermediária ao herbicida tembotrione, onde a F1 R♂ x S♀ apresenta comportamento mais próximo ao genitor suscetível, e a F1 S♂ x R♀ mais próxima ao genitor resistente.

## 6. Considerações finais

Os biótipos 32.1 e 32.2 oriundos de Panambi-RS são resistentes aos inibidores da HPPD tembotrione, mesotrione e isoxaflutole. O biótipo 32.2 apresenta resistência múltipla aos inibidores da HPPD e Protox e o biótipo 32.1 apresenta resistência múltipla a HPPD, Protox e ALS.

Os herbicidas pré-emergentes atrazina, flumioxazina e sulfentrazone são eficientes para o controle dos biótipos de leiteira, independente do tipo de resistência acumulada. Os herbicidas pós-emergentes atrazina, paraquat, paraquat+diuron, saflufenacil, glifosato, amônio glufosinato demonstraram controle satisfatório de todos os biótipos de leiteira.

Os biótipos de leiteira resistentes aos inibidores da HPPD apresentam como mecanismo de resistência a rápida metabolização do herbicida tembotrione, para um metabolito atóxico denominado de TCMBAs.

O incremento do período de exposição ao tembotrione do biótipo suscetível aos inibidores da HPPD resulta em rápido aumento da F0 e redução acentuada de Fm e Fv/Fm, em comparação aos biótipos resistentes. Os biótipos resistentes aos inibidores da HPPD demonstram menor declínio das variáveis fotossintéticas (A, Gs, E, CE e EUA), e menor incremento da Ci, em relação ao biótipo suscetível.

O incremento do período de exposição ao herbicida tembotrione acarretou no aumento significativo de estresse oxidativo no biótipo suscetível em comparação aos resistentes, evidenciado pelo aumento de TBARs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, extravasamento celular e menor conteúdo de carotenoides. A maior atividade da APX 96 horas após a aplicação de tembotrione, nos biótipos resistentes acarretou em menores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menores danos aos componentes celulares.

A herança da resistência de leiteira ao herbicida tembotrione é complexa, sendo codificada por genes nucleares de dominância incompleta.

## Referências

ABENDROTH, J.A.; MARTIN, A.R.; ROETH F.W. Plant response to combinations of mesotrione and photosystem II inhibitors. **Weed Science**, v.20, p.267-274, 2006.

ADELUSI, A.A.; ODUFEKO, G.T.; MAKINDE, A.M. Interference of *Euphorbia heterophylla* Linn. on the growth and reproductive yield of soybean (*Glycine max* Linn.) Merrill. **Research Journal of Botany**, v.2, p.85-94, 2006.

AGROFIT. **Sistema de registro de agrotóxicos do Ministério da Agricultura**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 08 jun. 2021.

AHRENS, H.; LANGE, G.; MÜLLER, T.; ROSINGER, C.; WILLMS, L.; VAN ALMSICK, A. 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors in combination with safeners: solutions for modern and sustainable agriculture. **Angewandte Chemie International Edition**, v.52, p.2-13, 2013.

ALFERNESS, P.; WIEBE, L. Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3926-3934, 2002.

ALI, A.; MALANGISHA, G.K.; YANG, H.; LI, C.; WANG, C.; YANG, Y.; MAHMOUD, A.; KHAN, J.; YANG, J.; HU, Z. Strigolactone alleviates herbicide toxicity via maintaining antioxidant homeostasis in watermelon (*Citrullus lanatus*). **Agriculture**, v.11, p. 1-19, 2021.

ALLEN, J.F. State transitions: A question of balance. **Science, New Series**, v.299, p.1530-1532, 2003.

ANDERSON, I.C.; ROBERTSON, D.S. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. **Plant Physiology**, v.35, p.531-534, 1960.

AVILA, L.A.; LEE, D.; SENSEMAN, S.A.; MCCAULEY, G.N.; CHANDLER, J.M.; COTHREN, 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, p.171-178, 2005.

BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1607-1621, 2004.

BALESTRASSE, K.B.; NORIEGA, G.O.; BATLLE, A.; TOMARO, M.L. Heme oxygenase activity and oxidative stress signaling in soybean leaves. **Plant Science**, v.170, p.339-346, 2006.

BANNON, J.S.; BAKER J.B.; ROGERS R.L. Germination of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*). **Weed Science**, v.26, p.221-225, 1978.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.DE.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, p.453-460, 2014.

BAROLI, I.; DO, A.D.; YAMANE, T.; NJYOGI, K.K. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. **The Plant Cell**, v.15, p.992-1008, 2003.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984. v.2, 377p.

BIANCHI, M.A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 23, Porto Alegre, RS. **Ata e Resumos...** Porto Alegre, UFRGS, 1996, 125p.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.170, p.489-504, 1987.

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

BRANCATO, A.; BROCCA, D.; CARRASCO, C.L.; DE LENTDECKER, C.; ERDOS, Z.; FERREIRA, L.; GRECO, L.; JARRAH, S.; KARDASSI, D.; LEUSCHNER, R.; LOSTIA, A.; LYTHGO, C.; MEDINA, P.; MIRON, I.; MOLNAR, T.; PEDERSEN, R.; REICH, H.; SACCHI, A.; SANTOS, M.; STANEK, A.; STURMA, J.; TARAZONA, J.; THEOBALD, A.; VAGENENDE, B.; VILLAMAR-BOUZA, L. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels for tembotrione according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. **EFSA Journal**, v.16, p.1-38, 2018.

BRECKE, B.J. Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) germination and emergence. **Weed Science**. v.43, p.103-106, 1995.

BRIDGES, D.C.; BRECKE, B.J.; BARBOUR, J.C. Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) Interference with Peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Science**, v. 40, p.37-42, 1992.

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

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, p.611-622, 2009.

CALVAYRAC, C.; BONTEMPS, N.; NOUGA-BISSOUE, A.; ROMDHANE, S.; COSTE, C.M.; COOPER, J.F. Photolysis of tembotrione and its main by-products under extreme artificial conditions: Comparison with another  $\beta$ -triketone herbicide. **Science of the Total Environment**, v.452, p.227–232, 2013.

CAVERZAN, A.; PIASECKI, C.; CHAVARRIA, G.; STEWART JR., C.N.; VARGAS, L. Defenses against ROS in crops and weeds: the effects of interference and herbicides. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.1-20, 2019.

CERNÝ, M.; HABÁNOVÁ, H.; BERKA, M.; LUKLOVÁ, M.; BRZOBOHATÝ, B.; Hydrogen peroxide: Its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.1-30, 2018.

CHAABANE, H. VULLIET, E.; CALVAYRAC, C.; COSTE, C.M.; COOPER, J.F. Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. **Pest Management Science**, v.64, p.86-93, 2008.

CHEMBASE. Disponível em: < <http://en.chembase.cn/substance-361097.html>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries históricas de área plantada, produtividade e produção**. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 03 abr. 2022.

CONCENÇO, G.; FERREIRA, E.A.; ASPIAZU, I.; SILVA, A.F.; GALON, L.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A.; ANDRES, A. Uso da água por plantas de arroz em competição com biótipos de *Echinochloa crusgalli* resistente e suscetível ao herbicida quinclorac. **Planta Daninha**, v.27, p.249-256, 2009.

CORREIA, M.A.; MONTELLANO, P.R.O. de. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: MONTELLANO, P.R.O. de, (ed). **Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry**, 3<sup>o</sup>ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 247-322, 2005.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.

DAN, H.DE.A.; BARROSO, A.L.DE.L. OLIVEIRA JUNIOR, R.S. DE.; DAN, L.G.DE. M.; PROCÓPIO, S.DE.O.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P. Potential use of tembotrione (HPPD-inhibitor herbicides) in grain sorghum. In: PRICE, A.J. (ED). **Weed Control**, Shanghai: InTech, 2012. p.171-184.

DAYAN, F.E. Current status and future prospects in herbicide discovery. **Plants**, v.8, p.2-18, 2019.

DAYAN, F.E.; DUKE, S.O.; SAULDUBOIS, A.; SINGH, N.; MCCURDY, C.; CANTRELL, C. *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for b-triketones from *Leptospermum scoparium*. **Phytochemistry**, v.68, p.2004-2014, 2007.

DAYAN, F.E.; ZACCARO, M.L.DE.M. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.102, p.189-197, 2012.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; CORRE, V.L. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v.29, p. 349-658, 2013.

DUKE, S.O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v.68, p.505-512, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, 2013. 353p.

EVANS, C.M.; STROM, S.A.; RIECHERS, D.E.; DAVIS, A.S.; TRANEL, P.J.; HAGER, A.G. Characterization of a waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population from Illinois resistant to herbicides from five site-of-action groups. **Weed Technology**, v.33, p.400-410, 2019.

FALK, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.1549-1566, 2010.

FARIA, A.T.; FIALHO, C.A.; SOUZA, M.F.; FREITAS, N.M.; SILVA, A.A. Sorption and desorption of tembotrione and its metabolite ae 1417268 in soils with different attributes. **Planta Daninha**, v.37, p.1-10, 2019.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.85, p.7-14, 2006.

FEYEREISEN, R. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. **Pest Management Science**, v.71, p.793-800, 2015.

FOYER, C.H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v.155, p.93-100, 2011.

FRANK, H.A.; BRUDVIG, G.W. Redox functions of carotenoids in photosynthesis. **Biochemistry**, v.43, p.1-9, 2004.

FRIGO, M.J.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; MACHADO, M. de F.P.S. Esterase polymorphism for analysis of genetic diversity and structure of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) populations. **Weed Science**, v.57, p.54-60, 2009.

FRITZE, I.M.; LINDEN, L.; FREIGANG, J.; AUERBACH, G.; HUBER, R.; STEINBACHER, S. The crystal structures of *Zea mays* and arabidopsis 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Plant Physiology**, v.134, p.1388-1400, 2004.

FU, Y.; WANG, M.; ZHAO, L.; ZHANG, S.; LIU, Y.; GUO, Y.; ZHANG, D.; GAO, S.; YE, F. Design, synthesis, herbicidal activity and CoMFA of aryl-formyl piperidinone HPPD inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.174, p.1-28, 2021.

FU, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, S.Q.; LIU, Y.X.; GUO, Y.Y.; WANG, M.X.; GAO, S.; ZHAO, L.X.; YE, F. Discovery of n-aroil diketone/triketone derivatives as novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibiting-based herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, p.11839-11847, 2019.

GAINES, T.A.; DUKE, S.O.; MORRAN, S.; RIGON, C.A.G.; TRANEL, P.J.; KÜPPER, A.; DAYAN, F.E. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v.30, p.10307-10330, 2020.

GALON, L.; CONCENÇO, G.; FERREIRA, E.A.; ASPIAZÚ, I.; SILVA, A.F.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A.; TIRONI, S.P.; FREITAS, M.A.M.; SOARES, E.R. Eficiência de uso da água em genótipos de cana-de-açúcar submetidos à aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v.28, p.777-784, 2010.

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

GAZZIERO, D.L.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; VARGAS, L.; KRUSE, N.D.; GALLI, A.J.B.; TREZZI, M.M. Critérios para relatos oficiais estatísticos de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.) **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Pelotas: Editora UFPel, 2014. p.44-53.

GAZZIERO, D.L.P.; VARGAS, L.; ROMAN, E.S. Manejo e controle de plantas daninhas em soja. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Manual e controle de plantas daninhas**. EMBRAPA, p.595-635, 2004.

GHANIZADEH, H.; BUDDENHAGEN, C.E.; HARRINGTON, K.C. JAMES, T.K. The Genetic Inheritance of Herbicide Resistance in Weeds. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.38, p.295-312, 2019.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GIANNAKOULA, A.; THERIOS, L.; CHATZISSAVVIDIS, C. Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in citrus (*Citrus aurantium* L.) plants. The role of

antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress. **Plants**, v.155, p.1-14, 2021.

GODAR, A.S.; VARANASI, V.K.; NAKKA, S.; PRASAD, P.V.V.; THOMPSON, C.R.; MITHILA, J. Physiological and molecular mechanisms of differential sensitivity of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to mesotrione at varying growth temperatures. **Plos One**, v.10, p.1-17, 2015.

GROSSMANN, K.; EHRHARDT, T. On the mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topramezone: a new inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Pest Management Science**, v.63, p.429-439, 2007.

HALLE, A.T.; DRNCOVA, D.; RICHARD, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. **Environmental Science & Technology**, v.40, p.2989-2995, 2006.

HALL, L.M.; STROME, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, v.46, p.390-396, 1998.

HAMPRECHT, G.; WITSCHERL, M.; HAWKES, T.R.; EDMUNDS, A.J.F.; MORRIS, J.A.; VAN ALMSICK, A. **Herbicides with bleaching properties**. Modern Crop Protection Compounds: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. 276p.

HASSANNEJAD, S.; LOTFI, R.; GHAFARBI, S.P.; OUKARROUM, A.; ABBASI, A.; KALAJI, H.M.; RASTOGI, A. Early identification of herbicide modes of action by the use of chlorophyll fluorescence measurements. **Plants**, v.9, p.1-10, 2020.

HAUSMAN, N.E.; SINGH, S.; TRANEL, P.J.; RIECHERS, D.E.; KAUNDUN, S.S.; POLGE, N.D.; THOMAS D.A.; HAGER, A.G. Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. **Pest Management Science**, v.67, p.258-261, 2011.

HEAP, I. **Criteria for confirmation of herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Documents/ResistanceCriterion.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

HEAP, I. **Internacional survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <[www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)>. Acesso em: 04 abr. 2022.

HUFFMAN, J.; HAUSMAN, N.E.; HAGER, A.G.; RIECHERS, D.E.; TRANEL, P.J. Genetics and inheritance of nontarget-site resistances to atrazine and mesotrione in a waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population from Illinois. **Weed Science**, v.63, p.799-809, 2015.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br>>. Acesso em: 09 fev. 2022.

INGROUILLE, M. **Diversity and evolution of land plants**. London, Chapman & Hall, 1992. 340p.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.345, p.646-651, 2006.

JARDIM-MESSEDER, D.; CAVERZAN, A.; RAUBER, R.; CUNHA, J.R.; CARVALHO, F.E.L.; GAETA, M.L.; FONSECA, G.C.; COSTA, J.M.; FREIG, M.; SILVEIRA, J.A.G.; MARGIS, R.; SAIBO, N.J.M.; PINHEIRO, M.M. Thylakoidal APX modulates hydrogen peroxide content and stomatal closure in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v.150, p.46-56, 2018.

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

JEFFORD, C.W.; CADBY, P.A. Evaluation of models for the mechanism of action of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Experientia**, v. 37, p.1134-1137, 1981.

JUNG, H.; KUK, Y.I.; BACK, K.; BURGOS, N.R. Resistance pattern and antioxidant enzyme profiles of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.91, p.53-65, 2008.

KAUNDUN, S.S.; HUTCHINGS, S.; DALE, R.P.; HOWELL, A.; MORRIS, J.A.; KRAMER, V.C.; SHIVRAIN, V.K.; MCINDOE, E. Mechanism of resistance to mesotrione in an *Amaranthus tuberculatus* population from Nebraska, USA. **Plos One**, v.12, p.1-22, 2017.

KHOROBYKH, S.; HAVURINNE, V.; MATTILA, H.; TYYSTJÄRVI, E. Oxygen and ROS in photosynthesis. **Plants**, v.91, p.1-63, 2020.

KIM, S.E.; BIAN, X.; LEE, C.J.; PARK, S.U.; LIM, Y.H.; KIM, B.H.; PARK, W.S.; AHN, M.J.; YOON, C.J.; YU, Y.; XIE, Y.; KWAK, S.S.; KIM, H.S. Overexpression of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (IbHPPD) increases abiotic stress tolerance in transgenic sweetpotato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.167, p.420-429, 2021.

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

KOHLHASE, D.R.; EDWARDS, J.W.; OWEN, M.D.K. Inheritance of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide resistance in an *Amaranthus tuberculatus* population from Iowa, USA. **Plant Science**, v.274, p.360-368, 2018.

KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A.; DALMAZ, C.; TREZZI, M.M.; SIQUEIRA, I. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v.24, p.379-390, 2006.

KSAS, B.; LÉGERET, B.; FERRETTI, U.; CHEVALIER, A.; POSPÍŠIL, P.; ALRIC, J.; HAVAUX, M. The plastoquinone pool outside the thylakoid membrane serves in plant photoprotection as a reservoir of singlet oxygen scavengers. **Plant, Cell & Environment**, v.41, p.2277-2287, 2018.

KÜPPER, A.; PETER, F.; ZÖLLNER, P.; LORENTZ, L.; TRANEL, P.J.; BEFFA, R.; GAINES, T.A. Tembotrione detoxification in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S.Wats.). **Pest Management Science**, v.1, p.1-10, 2017.

LEE, D.L.; KNUDSEN, C.G.; MICHAELY, W.J.; CHIN, H.; NGUYEN, N.H.; CARTER, C.G.; CROMARTIE, T.H.; LAKE, B.H.; SHRIBBS, J.M.; FRASER, T. The structure activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. **Pesticide Science**, v.54, p.377-384, 1998.

LEE, D.L.; PRISBYLLA, M.P.; CROMARTIE, T.H.; DAGARIN, D.P.; HOWARD, S.W.; PROVAN, W.M.L.; ELLIS, M.K.; FRASER, T.; MUTTER, L.C. The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Weed Science**, v.45, p.601-609, 1997.

LEE, S.H.; AHSANA, N.; LEE, K.W.; KIM, D.H.; LEE, D.G.; KWAK, S.S.; KWON, S.Y.; KIM, T.H.; LEE, B.H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1626-1638, 2007.

LEI, K.; HUA X.; TAO Y.; LIU, Y.; LIU, N.; MA, Y.; LI, Y.; XU, X.; KONG, C. Discovery of (2-benzoylolefin-1-yl)-containing 1, 2-benzothiazine derivatives as novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibiting-based herbicide lead compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.24, p.92-103, 2016.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, 1987. p.350-382.

LINDSTEDT, S.; HOLME, E.; LOCK, E.A.; HJALMARSON, O.; STRANDVIK, B. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Lancet**, v.340, p.813-817, 1992.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOHR, M.; IM, C.S.; GROSSMAN, A.R. Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, v.138, p.490-515, 2005.

LONG, S.P.; ZHU, X.G.; NAIDU, S.L.; ORT, D.R. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? **Plant, Cell and Environment** v.29, p.315-330, 2006.

LU, H.; YU, Q.; HAN, H.; OWEN, M.J.; POWLES, S.B. Evolution of resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a wild radish population via enhanced herbicide metabolism. **Pest Management Science**, v.76, p.1929-1937, 2020.

MACHADO, A.B.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A.; PATEL, F.; CIESLIK, L.F.; DEBASTIANI, F. Rendimento de grãos de feijão e nível de dano econômico sob dois períodos de competição com *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 33, p.41-48, 2015.

MACHADO, F.G.; JAKELAITIS, A.; GHENO, E.A.; OLIVEIRA JR., R.S. DE.; RIOS, F.A.; FRANCHINI, L.H.M.; LIMA, M.S. Performance de herbicidas para o controle de plantas daninhas no sorgo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.15, p.281-289, 2016.

MAEDA, H.; DELLAPENNA, D. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.260-265, 2007.

MA, R.; KAUNDUN, S.S.; TRANEL, P.J.; RIGGINS, C.W.; MCGINNESS, D.L.; HAGER, A.G.; HAWKES, T.; MCINDOE, E.; RIECHERS, D.E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. **Plant Physiology**, v.163, p.363-377, 2013.

MATRINGE, M.; SAILLAND, A.; PELISSIER, B.; ROLLAND, A.; ZINK, O. *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. **Pest Management Science**, v.61, p.269-276, 2005.

MCMULLAN, P.M.; GREEN, J.M. Identification of a tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype resistant to HPPD-inhibiting herbicides, atrazine, and thifensulfuron in Iowa. **Weed Technology**, v.25, p.514-518, 2011.

MENALLED, F.D.; PETERSON, R.K.D.; SMITH, R.G.; CURRAN, W.S.; PÁEZ, D.J.; MAXWEL, B.D. The eco-evolutionary imperative: Revisiting weed management in the midst of an herbicide resistance crisis. **Sustainability**, v.8, p.1-15, 2016.

MENDES, R.R.; TAKANO, H.K.; ADEGAS, F.S.; OLIVEIRA, R.S. JR.; GAINES, T.A.; DAYAN, F.E. Arg-128-Leu target-site mutation in PPO2 evolves in wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) with cross-resistance to PPO inhibiting herbicides. **Weed Science**, v.68, p.437-444, 2020b.

MENDES, R.R.; TAKANO, H.K.; LEAL, J.F.; SOUZA, A.S.; MORRAN, S.; OLIVEIRA, R.S. JR.; ADEGAS, F.S.; GAINES, T.A.; DAYAN, F.E. Evolution of EPSPS double mutation imparting glyphosate resistance in wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.). **Plos one**, v.15, p.1-17, 2020a.

MESCHEDE, D.K.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; SCAPIM, C.A. Período crítico de interferência de *Euphorbia heterophylla* na cultura da soja sob baixa densidade de semeadura. **Planta Daninha**, v.20, p.381-387, 2002.

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. p.101-128.

MITCHELL, G.; BARTLETT, D.W.; FRASER, T.E.M.; HAWKES, T.R.; HOLT, D.C.; TOWNSON, J.K.; WICHERT, R.A. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. **Pest Management Science**, v.57, p.120-128, 2001.

MITHILA, J.; GODAR, A.S. Understanding genetics of herbicide resistance in weeds: implications for weed management. **Advances in Crop Science and Technology**, v.1, p.1-4, 2013.

MITTLE, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MOUGET, J.L.; TREMBLIN, G. Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. **Aquatic Botany**, v.74, p.219-231, 2002.

MORAN, G.R. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.433, p.117-128, 2005.

NAKKA, S.; GODAR, A.S.; WANI P.S.; THOMPSON, C.R.; PETERSON, D.E.; ROELOFS, J.; JUGULAM, M. Physiological and molecular characterization of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)-inhibitor resistance in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S.Wats.). **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-12, 2017.

NARBONA, E.; ARISTA, M.; ORTIZ, P.L. Explosive seed dispersal in two perennial mediterranean *Euphorbia* species (Euphorbiaceae). **Americal Journal of Botany**, v.92, p.510-516, 2005.

NORRIS, S.R.; BARRETTE, T.R.; DELLAPENNA, D. Genetic dissection of catenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. **The Plant Cell**, v.7, p.2139-2149, 1995.

NEVE, P.; BUSI, R.; RENTONC, M.; VILA-AIUBB, M.M. Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. **Pest Management Science**, v.70, 1385-1393, 2014.

OLIVEIRA, M.C.; GAINES, T.A.; DAYAN, F.E.; PATTERSON, E.L.; JHALAC, A.J.; KNEZEVICA, S.Z. Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. **Pest Management Science**, v.1, p.1-11, 2017a.

OLIVEIRA, M.C.; GAINES, T.A.; JHALAC, A.J.; KNEZEVIC, S.Z. Inheritance of mesotrione resistance in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from nebraska, USA. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.1-12, 2018.

OLIVEIRA, M.C.; JHALA, A.J.; GAINES, T.; IRMAK, S.; AMUNDSEN, K.; SCOTT, J.E.; KNEZEVIC, S.Z. Confirmation and control of HPPD-inhibiting herbicide–

resistant waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) in Nebraska. **Weed Technology**, v.31, p.67-79, 2017b.

PAN, D.; LI, Q.X.; LIN, Z.; CHEN, Z.; TANG, W.; PAN, C.; TAN, H.; ZENG, D. Interactions between salicylic acid and antioxidant enzymes tilting the balance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from photorespiration in nontarget crops under halosulfuron-methyl stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.143, p.214-223, 2017.

PANDEY, S.; FARTYAL, D.; AGARWAL, A.; SHUKLA, T.; JAMES, D.; KAUL, T.; NEGI, Y.K.; ARORA, S.; REDDY, M.K. Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-13, 2017.

PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; HAGER, A.G. A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype with multiple resistance across three herbicide sites of action. **Weed Science**, v.53, p.30-36, 2005.

PAWŁOWSKA, B.; TELESINSKI, A.; BICZAK, R. Phytotoxicity of ionic liquids. **Chemosphere**, v. 237, p.1-12, 2019.

PEIXOTO, F.P.; LARANJO, J.G.; VICENTE, J.A.; MADEIRA, V.M.C. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.1125-1133, 2008.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

POGSON, B.J.; RISSLER, H.M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.355, p.1395-1403, 2000.

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

RADOSEVICH, R.S.; HOLT, J.S.; GHERSA, C. **Ecology of weeds and invasive plants**: relationship to agriculture and natural resource management. 3rd ed. New York: Wiley, 2007. 589p.

RAFAELI, R.S.; CUTTI, L.; SULZBACH, E.; ANDRES, A.; MARTINS, M.B.; MARKUS, C.; JUNIOR, A.M. Avaliação do mecanismo de resistência de herbicidas inibidores da ALS aplicados em pré e pós-emergência em capim-arroz. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2019, Balneário Camboriú. **Anais do XI Congresso brasileiro de arroz irrigado**, Balneário Camboriú: SOSBAI, 2019.

RANI, N.; DUHAN, A.; TOMAR, D. Ultimate fate of herbicide tembotrione and its metabolite TCMBA in soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.203, p.1-9, 2020.

RASTOGI, A.; ZIVCAK, M.; TRIPATHI, D.K.; YADAV, S.; KALAJI, H.M.; BRESTIC, M. Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. **Photosynthetica**, v.57, p.209-216, 2019.

RENTON, M.; BUSI, R.; NEVE, P.; THORNBY D.; VILA-AIUB, M. Herbicide resistance modelling: past, present and future. **Pest Management Science**, v.70, p.1-30, 2014.

ROJANO-DELGADO, A.M.; PORTUGAL, J.M.; PALMA-BAUTISTA, C.; CRUZ, R.A.; TORRA, J.; ALCÁNTARA, E.; PRADO, R.D. Target site as the main mechanism of resistance to imazamox in a *Euphorbia heterophylla* biotype. **Scientific Reports**, v.9, p.1-11, 2019.

RUIZ-SOLA, M.Á.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biosynthesis in arabidopsis: A colorful pathway. **American Society of Plant Biologists**, v.10, p.1-28, 2012.

SANTOS, J.B.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; COSTA, L.C. Produção e características qualitativas de sementes de plantas daninhas. **Planta daninha**, v.20, p.237-241, 2002.

SBCPD - SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina: 1995. 42 p.

SCHRYVER, M.G.; SOLTANI N.; HOOKER, D.C., ROBINSON, D.E.; TRANEL, P.J.; SIKKEMA, P.H. Control of glyphosate-resistant common waterhemp (*Amaranthus rudis*) in three new herbicide-resistant soybean varieties in Ontario. **Weed Technology**, v.31, p.828-837, 2017.

SHAH, T.K. **150 most recent crop protection active ingredients**. Disponível em: <<https://www.acs.org/content/dam/acsorg/events/drug-discovery/slides/2019-09-19-recent-crop-protection-poster.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2021.

SILVA, B.M. DA; ZANDONÁ, R.R. SILVA, J.G. DA; NETO, R. Á.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; ULGUIM, A. DA R.; Resistência de leiteira à inibidores da HPPD. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2016, Curitiba. **Anais do XXX Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**, Curitiba: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2016. p. 748.

SILVEIRA, H.M.; FERREIRA, E.A.; SILVA, D.V.; NETO, M.D.C.; CARVALHO, F.P.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A. Características fisiológicas de cultivares de mandioca após aplicação do mesotrione. **Planta Daninha**, v.31, p.403-409, 2013.

SONG, N. H.; YIN, X.L; CHEN, G.F.; YANG, H. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. **Chemosphere**, v. 68, p.1779-1787, 2007.

SOUSA, A.E.C.; LACERDA, C.F.DE; GHEYI, H.R.; SOARES, F.A.L.; UYEDA, C.A. Teores de nutrientes foliares e respostas fisiológicas em pinhão manso submetido a estresse salino e adubação fosfatada. **Revista Caatinga**, v.25, p.144-152, 2012.

SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing. and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. **Plant Science**, v.167, p.597-606, 2004.

SU, Y.; WANG, W.; HU, J.; LIU, X. Dissipation behavior, residues distribution and dietary risk assessment of tembotrione and its metabolite in maize via Quechers using HPLC-MS/MS technique. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.191, p.1-7, 2020.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, v.84, p.703-712, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 761 p.

THIELE, A.; KRAUSE, G. Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.324-332, 1994.

TORRA, J.; ROJANO-DELGADO, A.M.; MENÉNDEZ, J., SALAS, M.; PRADO, R. de. Cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance to imazamox and 2,4-D in *Papaver rhoeas*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.160, p.51-61, 2021.

TREBST, A.; DEPKA, B.; JÄGER, J.; OETTMEIER, W. Reversal of the inhibition of photosynthesis by herbicides affecting hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by plastoquinone and tocopheryl derivatives in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Pest Management Science**, v.60, p.669-674, 2004.

TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A.; KRUSE, N.D.; NUNES, A.L. Bioensaios para identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da Prottox. **Planta Daninha**, v. 24, p. 563-571, 2006.

TREZZI, M.M.; FELIPPI, C.L.; MATTEI, D.; SILVA, H.L.; NUNES, A.L.; DEBASTIANI, C.; VIDAL, R.A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health**, v.40, p.1-9, 2005.

TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A.; KRUSE, N.D.; GUSTMAN, M.S.; XAVIER, E.; ROSIN, D.; DEDORDI, G.F. Eletrolite leakage as a technique to diagnose *Euphorbia heterophylla* biotypes resistant to PPO-inhibitors herbicides. **Planta Daninha**, v.29, p. 655-662, 2011.

TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A.; KRUSE, N.D.; SILVA, R.P.; GUSTMANN, M.S.; FRANCHIN, E. Local de absorção de fomesafen como mecanismo de resistência em

biótipo de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores da Protox. **Planta Daninha**, v.27, p.139-148, 2009.

ULGUIM, A. DA R.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; SILVA, J.D.G. DA; SILVA, B. M. DA; WESTENDORFF, N. DA R. Agronomic factors involved in low-level wild poinsettia resistance to glyphosate. **Agrária**, v.12, p.51-59, 2017.

VAN ALMSICK, A. A new hppd-inhibitors - A proven mode of action as a new hope to solve current weed problems. **Outlooks on Pest Management**, v.20, p.27-30, 2009.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

VARANASI, V.K.; BRABHAM, C.; NORSWORTHY, J.K. Confirmation and characterization of non-target site resistance to fomesafen in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed science**, v.66, p.702-709, 2018.

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

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A.A. da. Técnica de cruzamentos controlados em *Euphorbia heterophylla* L. **Bragantia**, v.58, p.23-27, 1999.

VARGAS, L.; NOHATTO, M.A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M.A.; PAULA, J.M.; POLIDORO, E.; TOLEDO, R.E. Práticas de manejo e a resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da ALS e tolerância ao glyphosate no Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, v.31, p. 427-432, 2013.

VARSANO, R.; RABINOWITCH, H.D.; RUBIN, B. Mode of action of piperonyl butoxide as herbicide synergist of atrazine and terbutryn in maize. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.4, p.174-182,1992.

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

VIDAL, R.A.; MEROTTO JÚNIOR, A. Resistência de amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v.17, p.367-373, 1999.

VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M.; PRADO, R. de; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; VILA-AIUB, M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.5, p.265-269, 2007.

WANG, H.; LIU, W.; JIN, T.; PENG, X.; ZHANG, L.; WANG, J. Bipyrzone: a new HPPD-inhibiting herbicide in wheat. **Scientific Reports**, v.10, p.1-10, 2020.

WILSON, A.K. *Euphorbia heterophylla*; a review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, v.27, p.32-38, 1981.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1067-1072, 2003.

WITSCHERL, M. Design, synthesis and herbicidal activity of new iron chelating motifs for HPPD-inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.4221-4229, 2009.

XU, K.; RACINE, F.; HE, Z.; JUNEAU, P. Impacts of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor (mesotrione) on photosynthetic processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Pollution**, v.244, p.295-303, 2019.

YANG, C.; PFLUGRATH, J.W.; CAMPER, D.L.; FOSTER, M.L.; PERNICH, D.J.; WALSH, T.A. Structural basis for herbicidal inhibitor selectivity revealed by comparison of crystal structures of plant and mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenases. **Biochemistry**, v.43, p.10414-10423, 2004.

YOUNG, S.N.R.; DUNNING, L.T.; LIU, H.; STEVENS, C.J.; LUNDGREN, M.R. C<sub>4</sub> trees have a broader niche than their close C<sub>3</sub> relatives. **Journal of Experimental Botany**, v.73, p.3189-3204, 2022.

YUGUDA, U.A.; JAPHET, W.S.; ABUBAKAR, B.Y.; ABDULLAHI, S.; DAUDA, S. Phenotypic plasticity of *Euphorbia heterophylla* L. and *Sida acuta* Burm. F. in response to soil fertility, irrigation interval and plant density in northern Guinea Savannah, Nigeria. **Journal of Biology and Nature**, v.5, p.185-195, 2016.

ZITO, F.; FINAZZI, G.; DELOSME, R.; NITSCHKE, W.; PICOT, D.; WOLLMAN, F.A. The Qo site of cytochrome b<sub>6</sub>f complexes controls the activation of the LHCII kinase. **The EMBO Journal**, v.18, p.2961-2969, 1999.