

LEANDRO VARGAS

RESISTÊNCIA DE *Euphorbia heterophylla* L. AOS HERBICIDAS INIBIDORES  
DA ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE (ALS/AHAS)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae.”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2000

Aos meus pais Querino (*in memoriam*) e Olga Vargas.  
À minha esposa Adriane Regina Bortolozzo.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antonio Alberto da Silva, pela amizade e pela orientação constante e segura.

Aos conselheiros Aluizio Borém de Oliveira, Francisco Affonso Ferreira e Maurílio Alves Moreira, pela orientação e pelas sugestões sempre oportunas.

Aos professores Sebastião Tavares de Rezende, Tocio Sedyama e Múcio Silva Reis, pelas sugestões, que muito contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao meu grande amigo e companheiro João Gilberto Siqueira, pela disponibilidade.

Ao laboratorista Luis e aos bolsistas Lico, Daí, Arlindo, Barbosa, Vanessa e Rita, por estarem sempre prontos em me auxiliar.

A todos que contribuíram para a realização deste projeto.

## **BIOGRAFIA**

LEANDRO VARGAS, filho de Querino Vargas e Olga Vargas, nasceu em 23 de maio de 1968, em Ernestina, RS.

Em 1988, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade de Passo Fundo, RS, concluindo-o em janeiro de 1993.

Em março de 1994, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, concluindo-o em maio de 1996.

Em março de 1997, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2000.

Atualmente, é professor do Curso de Agronomia da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Unaí, em Unaí, Minas Gerais.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE <i>Euphorbia heterophylla</i> L. RESISTENTES A HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETOLACTATO SINTASE (ALS/HAS) .....	7
RESUMO .....	7
IDENTIFICATION OF <i>Euphorbia Heterophylla</i> L. BIOTYPES RESISTANT TO HERBICIDES INHIBITORS OF ACETOLACTATE SYNTHASE (ALS/AHAS) .....	8
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
2.1. Extração e purificação parcial da acetolactato sintase .....	11
2.2. Preparo das diluições herbicidas .....	12
2.3. Bioensaio <i>in vitro</i> com a enzima acetolactato sintase .....	13
2.4. Determinação dos parâmetros $K_M$ e $V_{máx}$ aparentes .....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14

	Página
4. CONCLUSÕES .....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
CONTROLE QUÍMICO DE <i>Euphorbia heterophylla</i> L. RESISTENTE A HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS .....	25
RESUMO .....	25
CHEMICAL CONTROL OF <i>Euphorbia heterophylla</i> L. BYOTYPES RESISTANT TO HERBICIDES INHIBITORS OF ALS .....	26
ABSTRACT .....	26
1. INTRODUÇÃO .....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4. CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
TÉCNICA DE CRUZAMENTOS CONTROLADOS EM <i>Euphorbia</i> <i>heterophylla</i> L. ....	35
RESUMO .....	35
CROSSING TECHNIQUE IN <i>Euphorbia heterophylla</i> L. ....	36
ABSTRACT .....	36
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4. CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE LEITEIRO ( <i>Euphorbia heterophylla</i> L.) AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS .....	44
RESUMO .....	44
INHERITANCE OF ALS INHIBITORS RESISTANCE IN <i>Euphorbia</i> <i>heterophylla</i> L. BIOTYPES .....	45
ABSTRACT .....	45
1. INTRODUÇÃO .....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	48

	Página
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4. CONCLUSÕES .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
2. RESUMO E CONCLUSÕES .....	54
APÊNDICE .....	56

## RESUMO

VARGAS, Leandro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2000.  
**Resistência de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS).** Orientador: Antônio Alberto da Silva. Conselheiros: Aluízio Borém de Oliveira, Francisco Affonso Ferreira e Maurílio Alves Moreira.

A ocorrência de plantas daninhas resistentes a herbicidas é um fato novo no Brasil. A caracterização da resistência é importante para embasar previsões e eleger métodos de manejo e controle. Desse modo, foram realizados na Universidade Federal de Viçosa, de março de 1997 a julho de 1999, quatro experimentos, objetivando de identificar biótipos resistentes e caracterizar a resistência. O primeiro experimento objetivou identificar e estudar os mecanismos envolvidos na resistência, cujos resultados indicaram resistência cruzada aos herbicidas inibidores da enzima ALS. Estudos com ALS, extraída de plantas resistentes de leiteiro, indicaram  $I_{50}$  superior a 3.000  $\mu\text{M}$  para o imazapyr e 2.000  $\mu\text{M}$  para o imazethapyr, contrastando com valores de  $I_{50}$  de 2  $\mu\text{M}$  para aquele e 0,7  $\mu\text{M}$  para este em plantas sensíveis. No segundo experimento, investigou-se a resposta dos biótipos resistentes a herbicidas com diferentes mecanismos de ação. Constatou-se que os herbicidas inibidores da ALS controlaram com eficiência o biótipo sensível, à exceção do flumetsulan; já sobre o biótipo resistente, somente o herbicida imazapyr, na maior dose,

apresentou controle. Os herbicidas com mecanismos de ação distintos daqueles dos inibidores da ALS apresentaram-se altamente eficientes no controle dos biótipos resistentes e sensíveis quando aplicados de forma isolada ou em mistura. O terceiro experimento objetivou descrever uma técnica de cruzamento controlado em *Euphorbia heterophylla* L. Os resultados evidenciaram que as polinizações e emasculações realizadas no estágio 1 produzem grande número de ciátios com uma ou duas sementes e raramente com três. As realizadas no estágio 2, ou acima deste, garantiram o sucesso dos cruzamentos com boa produção de sementes. No quarto experimento, estudaram-se a herança, o número de genes que conferem a resistência e o grau de resistência dos biótipos homozigotos e heterozigotos resistentes. As plantas F<sub>1</sub> mostraram-se totalmente resistentes ao herbicida, indicando que a resistência é nuclear e dominante. As plantas F<sub>2</sub> apresentaram alta probabilidade para segregação 3:1, evidenciando que a resistência é codificada por um gene dominante. Pela aplicação de doses crescentes de imazethapyr sobre as plantas F<sub>1</sub>, calculou-se que os biótipos homozigotos resistentes e os heterozigotos apresentaram o mesmo grau de resistência para doses de até 1.600 g ha<sup>-1</sup> desse herbicida. Os resultados permitiram concluir que a insensibilidade da enzima ALS aos herbicidas que a inibem é o principal mecanismo responsável pela resistência das plantas de *Euphorbia heterophylla* L. a tais produtos. Os biótipos resistentes são controlados com eficiência com herbicidas com mecanismos de ação distintos daqueles dos inibidores da ALS. A resistência é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa.

## ABSTRACT

VARGAS, Leandro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2000.  
**Resistance of *Euphorbia heterophylla* L. to acetolactate syntase (ALS/AHAS) inhibitor herbicides.** Adviser: Antônio Alberto da Silva.  
Committee members: Aluizio Borém de Oliveira, Francisco Affonso Ferreira and Maurílio Alves Moreira.

The occurrence of herbicide-resistant weeds is a new fact in Brazil. The characterization of the resistance is important to provide a base for previsions and select methods of management and control. Therefore, four experiments were carried out at the Universidade Federal de Viçosa, from March, 1997, to July, 1999, to identify resistant biotypes and to study the mechanisms involved in resistance. The first experiment, aimed to identify and study the mechanisms involved in the resistance, had the results indicating cross resistance to ALS inhibitory herbicides. Studies with ALS, extracted from resistant plants, showed  $I_{50}$  superior to 3000  $\mu\text{M}$  for imazapyr and 2000  $\mu\text{M}$  for imazethapyr, which contrasted with  $I_{50}$  values of 2  $\mu\text{M}$  for the former and 0.7  $\mu\text{M}$  for the latter in susceptible plants. The second experiment analyzed the response of the resistant biotypes to herbicides with different modes of action. It was verified that the ALS inhibitory herbicides had efficient control over the susceptible biotypes, apart from flumetsulan; as for the resistant biotype, only the herbicide imazapyr at its highest dose, showed control. The herbicides with modes of

action distinct from those ALS inhibitors were shown highly efficient on controlling susceptible and resistant biotypes when applied separately or in mixture. The third experiment aimed to describe a technique of controlled crossings in *Euphorbia heterophylla* L. The results showed evidence that pollination and emasculation performed at stage 1 produce a great number of ciatios with one or two seeds and rarely with three. Those performed at stage 2, or above this stage, assured the success of the crossings with a good production of seeds. In the fourth experiment, the inheritance, the number of genes that confer resistance and the degree of resistance in resistant homozygote and heterozygote biotypes, were studied. The F<sub>1</sub> plants were shown totally resistant to the herbicide, indicating that the resistance is nuclear and dominant. The F<sub>2</sub> plants presented a high probability for 3:1 segregation, making evident that the resistance is codified by a dominant gene. It was calculated that the biotypes resistant homozygote and heterozygote showed the same degree of resistance for doses up to 1600 g ha<sup>-1</sup>, by means of the application of increasing doses of imazethapyr on F<sub>1</sub> plants. The results obtained permit the conclusion that the insensitivity of the ALS enzyme to the herbicides is the primary mechanism responsible for the resistance of *Euphorbia heterophylla* L. to such products. The resistant biotypes are efficiently controlled by herbicides with mechanism of action distinct from those of the ALS inhibitors. The resistance is codified by a nuclear dominant gene with complete dominance.

## 1. INTRODUÇÃO

O surgimento de plantas daninhas resistentes a herbicidas, no Brasil, tem como causa mais provável o uso repetido desses produtos. A resistência aos herbicidas assume maior importância a partir do momento em que o número de ingredientes ativos disponíveis no mercado para controle de determinadas espécies é muito restrito. Os biótipos resistentes não respondem mais a aplicações de produtos aos quais adquiriram resistência, mesmo quando estes são usados em altas doses. Dessa forma, inviabiliza-se o emprego dessas moléculas como opção de controle, restringindo a prática de controle a moléculas alternativas ou a outros métodos menos eficientes.

Os herbicidas pertencentes aos grupos químicos imidazolinonas, pirimidiloxibenzoatos, sulfoniluréias e sulfonamidas agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS). Tais herbicidas são largamente utilizados por causa da sua baixa toxicidade para animais, alta seletividade para as culturas e alta eficiência com emprego de doses baixas (HESS, 1994; AHRENS, 1994).

A ALS é uma enzima, codificada por um gene nuclear, que atua na rota de biossíntese do acetolactato e do acetoidroxiacetato, que são precursores dos aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina. É a primeira enzima comum à síntese desses aminoácidos. Ela catalisa a condensação de dois

piruvatos para formar o acetolactato e de um piruvato com 2-oxobutirato para produzir acetoidroxibutirato (STIDHAM e SINGH, 1991).

A espécie *Bidens pilosa* L. foi a primeira a apresentar biótipos resistentes no Brasil. Em estudos realizados na Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz (ESALQ), reconheceu-se a existência de biótipos dessa espécie resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, evidenciando que a insensibilidade da enzima parece ser a principal causa. Contudo, herbicidas com outros mecanismos de ação, como sulfentrazone, bentazon, lactofen, fomesafen e acifluorfen, controlam eficientemente esses biótipos (PONCHIO, 1997). Plantas resistentes aos inibidores da enzima ALS são sensíveis a herbicidas com diferentes mecanismos de ação (PRIMIANI et al., 1990).

Segundo SAARI et al. (1994), todas as plantas daninhas resistentes a um inibidor da ALS também o são a outros herbicidas inibidores dessa mesma enzima. Entretanto, um biótipo de *Lactuca serriola* resistente à mistura de chlorsulfuron/metsulfuron é resistente a outras sulfoniluréias, porém, no que se refere ao grupo químico imidazolinona, ele resiste ao imazapyr e ao imazethapyr e é sensível ao imazaquin (MALLORY-SMITH et al., 1990).

O uso de herbicidas com outros mecanismos de ação e misturas desses produtos é alternativa para controle, em curto prazo, dos biótipos resistentes e para redução da pressão de seleção (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

O leiteiro, *Euphorbia heterophylla* L., é uma planta daninha comum no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. É uma espécie nativa nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (CRONQUIST, 1981). Apresenta porte médio de 40-60 cm, sendo altamente competitiva, com crescimento e multiplicação rápidos. O caule é simples ou ramificado, apresentando nodificações em intervalos regulares. As folhas são alternas, opostas ou verticiladas e ocorrem tanto no caule como nos ramos; na parte final dos ramos, abaixo da inflorescência, há concentração de folhas (CRONQUIST, 1981; KISSMANN e GROTH, 1992).

A flor do leiteiro é uma estrutura bissexual denominada ciátio (CRONQUIST, 1981). Na inflorescência, localizada na parte terminal do caule e dos ramos, desenvolvem-se conjuntos de ciátios. Estes são invólucros obovóides com cerca de 2,5 mm de comprimento, formados por brácteas

fusionadas abertas na parte superior. Cada ciátio abriga 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. Cada flor masculina é formada por um estame, articulado no pedicelo; os estames circundam a flor feminina (KISSMANN e GROTH, 1992). O sistema de reprodução pode ser tanto por autofecundação como por fecundação cruzada (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984; INGROUILLE, 1992). Não foram encontradas referências sobre a taxa de alogamia dessa espécie.

O fruto, à medida que amadurece, altera a coloração e, quando atinge plena maturação, apresenta deiscência explosiva, lançando as sementes para longe da planta-mãe (BARROSO, 1984).

As sementes podem ter formas globosas, ovóides, cônicas, mais ou menos angulares, com 2,5 a 3 mm de comprimento por 2,5 mm de largura. Apresentam dois cotilédones e testa escura, marmorada ou não (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984; KISSMANN e GROTH, 1992). As sementes são produzidas em grande quantidade e possuem dormência. A causa da dormência não é conhecida, mas a luz, aliada a temperaturas alternadas de 25 e 35 °C, estimula a germinação (KISSMANN e GROTH, 1992). As sementes germinam a uma profundidade de 4 cm; em lavouras de soja no Rio Grande do Sul e Paraná, foi observado germinação escalonada (KISSMANN e GROTH, 1992).

O ciclo curto da *Euphorbia heterophylla* L. permite duas a três gerações por ano em determinados locais. Essa espécie se desenvolve bem em quase todos os tipos de solo, preferindo, no entanto, solos férteis e bem drenados. A via fotossintética do leiteiro é C<sub>4</sub>, e o seu número cromossômico básico é 2n = 32 (KISSMANN e GROTH, 1992).

O controle da *Euphorbia heterophylla* L. em lavouras de soja tem sido realizado com emprego de herbicidas, principalmente aqueles pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas. Entretanto, nos últimos anos, a eficiência desses herbicidas tem sido menor, principalmente em algumas lavouras do Rio

Grande do Sul, onde tais compostos são empregados desde o início da década de 80. Nessas lavouras, esta espécie inicialmente se mostrava altamente sensível a esses produtos. Tal fato provocou suspeitas de que a espécie poderia ter adquirido resistência aos herbicidas inibidores da ALS, como já confirmado em picão-preto. O uso repetido de herbicidas inibidores da ALS em lavouras de soja, nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul, levou à seleção de genótipos de *Bidens pilosa* L. resistentes a esses herbicidas (PONCHIO, 1997). A primeira espécie resistente aos herbicidas inibidores da ALS surgiu aproximadamente cinco anos após o início do uso desses herbicidas (SAARI et al., 1994).

O número de plantas remanescentes de leiteiro naquelas lavouras aumentou com o passar do tempo, evidenciando que os biótipos resistentes estavam se tornando prevaletentes rapidamente e que a resistência estava sendo transmitida hereditariamente. No entanto, em locais onde herbicidas inibidores da ALS não foram empregados, tal fato não tem ocorrido. Essas constatações indicam que o herbicida selecionou biótipos resistentes e que a eliminação das plantas sensíveis proporcionou condições favoráveis para que os indivíduos resistentes se multiplicassem e se tornassem predominantes no local, como relataram HOLT e LEBARON (1990) e BETTS et al. (1992). Os objetivos deste trabalho foram: identificar e estudar os mecanismos que conferem a resistência; avaliar a resposta dos biótipos resistentes a herbicidas com diferentes mecanismos de ação; descrever uma técnica de cruzamento controlado em *Euphorbia heterophylla* L.; e estudar a herança, o número de genes que conferem a resistência e o grau de resistência dos biótipos homocigotos e heterocigotos resistentes.

A introdução deste trabalho seguiu as normas da UFV para feitura de tese, e os artigos foram escritos de acordo com as normas da revista BRAGANTIA, por recomendação do comitê de orientação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, W.H. (Ed.). **Herbicide handbook**. 7.ed. Champaign: Weed Science Society of America, 1994. 352p.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1984. v.2, 377p.
- BETTS, K.J., EHLKE, N.J., WYSE, D.L., GRONWALD, J.W., SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**, Champaign, v.40, n.2, p.184-189, 1992.
- CHRISTOFFOLETI, P.J., VICTÓRIA FILHO, R., SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Brasília, v.12,n.1, p.13-20, 1994.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.
- HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: HERBICIDE ACTION COURSE, 1994. **Summary of lectures**. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.
- HOLT, J.S., LEBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.141-149, 1990.
- INGROUILLE, M. **Diversity and evolution of land plants**. London: Chapman & Hill, 1992. 340p.
- KISSMANN, K.G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 1992. 798p.

- MALLORY-SMITH, C.A., THILL, D.C., DIAL, M.J. Identification of sulfonylurea herbicide-resistance prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, Champaign, v.4, n.1, p.163-168, 1990.
- PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* L. a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS**. Piracicaba-SP: ESALQ, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1997.
- PRIMIANI, M.M., COTTERMAN, J.C., SAARI, L.L. Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.169-172, 1990.
- SAARI, L.L., COTTERMAN, J.C., THILL, D.C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S.B., HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994. p.83-139.
- STIDHAM, M.A., SINGH, B.K. Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. In: SHANER, D.L., O’CONNOR, S.L. **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.71-90.

**IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L.  
RESISTENTES A HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETOLACTATO SINTASE  
(ALS/AHAS)**

**RESUMO**

Os herbicidas inibidores da ALS são os principais produtos empregados para o controle do leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) em lavouras de soja. Contudo, já foram identificados biótipos resistentes a esses herbicidas. Com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos na resistência de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da ALS, foram realizados estudos com biótipos resistentes e sensíveis dessa espécie. Os resultados indicaram resistência cruzada aos herbicidas inibidores da enzima ALS. Os biótipos que adquiriram a resistência passaram a tolerar doses 10 vezes superiores à recomendada. Apresentaram GR<sub>50</sub> de 531,94 g ha<sup>-1</sup> para imazapyr e de 1.232,02 g ha<sup>-1</sup> para imazethapyr, contrastando com os biótipos sensíveis, que apresentaram GR<sub>50</sub> de 10 g ha<sup>-1</sup> para imazapyr e de 13 g ha<sup>-1</sup> para imazethapyr. Os estudos com a enzima ALS, extraída de plantas resistentes de leiteiro, evidenciaram efeito reduzido dos inibidores dessa enzima sobre sua atividade, sendo o I<sub>50</sub> superior a 3.000 µM para o imazapyr e 2.000 µM para o imazethapyr, contrastando com valores de I<sub>50</sub> de 2 µM para o imazapyr e de 0,7 µM para o imazethapyr nas plantas sensíveis. Dessa forma, em razão da grande diferença de I<sub>50</sub>, concluiu-se que as plantas de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos inibidores da ALS apresentam como mecanismo de resistência a insensibilidade da enzima ALS aos herbicidas estudados.

**Termos de indexação:** imidazolinonas, sulfoniluréias e resistência a herbicidas.

**IDENTIFICATION OF *Euphorbia Heterophylla* L. BIOTYPES RESISTANT  
TO HERBICIDES INHIBITORS OF ACETOLACTATE SYNTHASE  
(ALS/AHAS)**

**ABSTRACT**

The ALS-inhibitor herbicides are the main products employed for controlling the *Euphorbia heterophylla* in *Glycine max* fields. However, resistant biotypes to these herbicides have already been identified. With the objective of studying the mechanisms involved in the resistance of *Euphorbia heterophylla* L. to the herbicides inhibitors of ALS, studies were carried out with resistant and sensitive biotypes of that species. The results indicate cross resistance to the herbicides inhibitors of the enzyme ALS. The biotypes that acquired resistance started to tolerate doses ten times higher than those recommended. They presented GR<sub>50</sub> of 531.94 g ha<sup>-1</sup> for imazapyr and of 1,232.02 g ha<sup>-1</sup> for the imazethapyr, contrasting with the sensitive biotypes that presented GR<sub>50</sub> of 10 g ha<sup>-1</sup> for imazapyr and of 13 g ha<sup>-1</sup> for the imazethapyr. The studies with the ALS enzyme demonstrated that the herbicides inhibitors of this enzyme presents reduced effect on its activity, being the I<sub>50</sub> superior to 3,000 µM for the imazapyr and 2,000 µM for the imazethapyr. On the other hand, ALS of sensitive plants presented I<sub>50</sub> of 2 µM for the imazapyr and 0.7 µM for the imazethapyr. In this way, the insensibility of the ALS, of the resistant plants to the herbicides that act inhibiting it, can be considered the main responsible for the resistance of the *Euphorbia heterophylla* L. biotypes to such products.

**Index terms:** imidazolinone, sulfonyleurea, herbicide resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso repetido de um mesmo herbicida ou mecanismo de ação herbicida levou à seleção de biótipos de espécies daninhas resistentes a esses produtos. A alta pressão de seleção exercida pelo repetido uso de herbicidas para controle de plantas daninhas está provocando mudanças na flora de algumas regiões. Em geral, espécies e, ou, biótipos de uma espécie que melhor se adaptam a determinada prática são selecionados e multiplicam-se rapidamente (Holt & Lebaron, 1990). Evidências têm indicado que o aparecimento de resistência a um herbicida em uma população de plantas é devido à seleção de genótipos resistentes preexistentes, que, devido à pressão de seleção exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida, encontram condições para multiplicação (Betts et al., 1992).

Os herbicidas pertencentes aos grupos químicos imidazolinonas, pirimidiloxibenzoatos, sulfoniluréias e sulfonamidas, agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS), que atua na rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Hess, 1994). Esses herbicidas são largamente utilizados por causa de sua baixa toxicidade a animais, alta seletividade às culturas e alta eficiência mesmo em doses baixas. Aproximadamente cinco anos após o início do uso desses herbicidas, surgiu a primeira espécie resistente a estes.

Nos últimos 10 anos, aumentou o número de espécies com biótipos que apresentam resistência aos herbicidas inibidores da ALS. No Brasil, Ponchio (1997) descreveu a resistência de biótipos de picão-preto (*Bidens pilosa* L.) a herbicidas desse grupo.

O leiteiro, *Euphorbia heterophylla* L., é uma planta daninha encontrada em vários estados brasileiros. O uso de herbicidas inibidores da ALS para seu controle é prática comum em lavouras de soja e feijão. Entretanto, nos últimos anos, vem sendo observado, em algumas regiões, baixo controle dessa espécie daninha. Tal fato tem provocado suspeitas de que essas plantas possam ter adquirido resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS, como já foi detectado em picão-preto.

O objetivo do presente trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na resistência dos biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da ALS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para identificar os biótipos resistentes, foram realizados três experimentos em casa de vegetação, e, em laboratório, foi extraída a enzima ALS de biótipos resistentes e sensíveis e medida a sua atividade em resposta a doses crescentes dos herbicidas imazapyr e imazethapyr.

Os procedimentos de instalação e condução foram semelhantes nos três experimentos, a saber: foram semeadas quatro sementes de leiteiro em recipientes com capacidade para 300 mL contendo solo adubado. Após a emergência das plantas, foi procedido desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Os herbicidas eram aplicados com aspersor costal de precisão, com volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup> quando as plantas atingiam o estágio de 3-4 folhas. O delineamento experimental usado foi o completamente casualizado, com quatro repetições. A toxicidade dos tratamentos herbicidas foi avaliada, utilizando-se escala percentual, em que nota zero significou nenhum efeito de dano às plantas e nota 100 representou morte ou completa supressão destas.

No primeiro experimento, foram colhidas sementes de 374 plantas de leiteiro, de forma aleatória e individualmente, em uma lavoura de soja no Município de Ernestina, RS, onde se empregavam herbicidas inibidores da ALS desde o início da década de 80 e onde se suspeitava estar ocorrendo resistência. Também, foram colhidas sementes de seis plantas em área nunca pulverizada com esses produtos, para servir de testemunha, totalizando-se 380 indivíduos. As progênies desses indivíduos foram tratadas com 200 g ha<sup>-1</sup> do herbicida imazethapyr ao atingirem estágio de 3-4 folhas. A toxicidade dos tratamentos herbicidas foi avaliada aos 14 e 21 DAT (dias após o tratamento), e os biótipos resistentes foram selecionados e identificados.

No segundo experimento, foram aplicadas as doses crescentes 0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 50; e 100 g ha<sup>-1</sup> sobre o biótipo sensível e 50; 100; 200; 400;

800; 1.600; e 3.200 g ha<sup>-1</sup> sobre o biótipo resistente dos herbicidas imazapyr e imazethapyr. Aos 14 DAT, as plantas foram colhidas; após a secagem em estufa a uma temperatura de 60 °C, até atingir peso constante, foi determinada a produção de matéria seca dos biótipos em cada tratamento. A avaliação da produção de matéria seca em resposta às referidas doses herbicidas pela análise de regressão possibilitou o cálculo do GR<sub>50</sub> (dose necessária para reduzir 50% da produção de matéria seca).

No terceiro experimento, avaliou-se a resposta de um biótipo de leiteiro resistente e de um sensível a diferentes herbicidas e mecanismos de ação. Para isso, os dois biótipos foram tratados com os herbicidas imazaquin (150 g ha<sup>-1</sup>), imazethapyr (100 g ha<sup>-1</sup>), imazamox (40 g ha<sup>-1</sup>), imazapyr (625 g ha<sup>-1</sup>), nicosulfuron (80 g ha<sup>-1</sup>), lactofen (156 g ha<sup>-1</sup>), fomesafen (250 g ha<sup>-1</sup>), atrazine (3.200 g ha<sup>-1</sup>), cyanazine (2.000 g ha<sup>-1</sup>), 2,4-D (1.005 g ha<sup>-1</sup>), glufosinate (400 g ha<sup>-1</sup>), glyphosate (720 g ha<sup>-1</sup>), sulfosate (960 g ha<sup>-1</sup>) e paraquat (400 g ha<sup>-1</sup>). Acrescentou-se ainda uma testemunha, sem tratamento herbicida.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Constatado o efeito significativo dos tratamentos, procedeu-se, então, à complementação da análise com teste de médias.

## **2.1. Extração e purificação parcial da acetolactato sintase**

A metodologia utilizada se baseou em Carey et al. (1997), porém foram necessárias algumas modificações para se adequar às situações particulares da espécie e do laboratório. Assim, os procedimentos foram os seguintes: 25 g de folhas de leiteiro foram colhidos e armazenados em gelo para serem transportados até o laboratório, onde foram congelados com N<sub>2</sub> líquido e macerados em almofariz. A seguir, o macerado foi dissolvido em 100 mL (1:4 p/v) do tampão de extração, composto de: tampão fosfato 100 mM; pH 7,5; 0,5 mM de cloreto de magnésio; 1 mM de piruvato de sódio; 0,5 mM de tiamina pirofosfato (TPP); 10 µM de flavina adenina dinucleotídio (FAD); 10% v/v de glicerol; 1 mM de ditiotreitól; e 5% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Alternativamente, o ditiotreitól e o polivinilpolipirrolidona não compõem o tampão e são acrescentados antes da homogeneização do macerado e do

tampão contendo os demais reagentes. Posteriormente, o homogenato foi colocado sob agitação, em geladeira (4 °C), por 20 minutos.

A mistura foi, então, filtrada em tecido de algodão duplo, para retirar os resíduos sólidos do extrato. O resíduo sólido foi descartado, e da parte líquida retirou-se uma alíquota de 50 mL, à qual foi adicionado lentamente, sob agitação, sulfato de amônio até atingir 20% de saturação, agitando-se até a completa dissolução de todo o sal. Depois disso, a mistura foi centrifugada a 27.000 x g por 20 minutos a 4 °C. Separou-se o sobrenadante, e o precipitado foi descartado. Procedeu-se à nova adição de sulfato de amônio ao sobrenadante até atingir 50% de saturação, centrifugando-se novamente de forma idêntica à primeira. Posteriormente, foi aproveitado o precipitado e descartado o sobrenadante. O precipitado protéico foi, então, ressuspensão em 2 mL do tampão de eluição (tampão fosfato 20 mM, pH 7,0; 0,5 mM de cloreto de magnésio; 20 mM de piruvato de sódio; 0,5 mM de tiamina pirofosfato (TPP); e 10 µM de flavina adenina dinucleotídio (FAD)) e centrifugado em eppendorf a 14.000 rpm, por 10 minutos, para separar resíduos sólidos que poderiam provocar entupimento da coluna cromatográfica usada na etapa seguinte, de dessalinização da amostra enzimática. Todos os procedimentos foram realizados com as amostras em banho-de-gelo.

Após a centrifugação, a amostra enzimática foi submetida à cromatografia por gel-filtração em coluna (18 x 1,5 cm) de Sephadex G-25 Medium, previamente equilibrada com tampão de eluição. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão de fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

## **2.2. Preparo das diluições herbicidas**

Foram preparadas soluções aquosas de herbicidas 1 e 4 mM para imazethapyr e 1, 4 e 20 mM para imazapyr em metanol 25%. As concentrações não foram maiores em razão da limitação de solubilidade dos herbicidas. A partir dessas soluções-estoque, calcularam-se as quantidades de herbicida a serem adicionadas em cada tubo de ensaio para realização dos ensaios de inibição. As concentrações herbicidas finais empregadas no tubo de ensaio

foram 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; e 8  $\mu\text{M}$  para a ALS sensível e 0; 500; 1.000; 1.500; 2.000; e 3.000  $\mu\text{M}$  para a ALS resistente.

O bioensaio conteve dois tratamentos-padrão, sem o herbicida, denominados zero e 100% de atividade. O primeiro denominado zero (0% de atividade da ALS) recebeu 50  $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico 3 M no início do bioensaio, antes da adição do piruvato (substrato), e o segundo foi o tratamento-padrão, testemunha sem inibidor (100% de atividade da ALS).

### **2.3. Bioensaio *in vitro* com a enzima acetolactato sintase**

O tempo do ensaio utilizado na primeira incubação, quando a enzima ALS converte o substrato piruvato em acetolactato, é variável na literatura. O tempo de ensaio utilizado nestes ensaios foi determinado por meio da curva de tempo, na qual se determinou a formação do produto em função do tempo.

Adicionaram-se a cada tubo de ensaio 200  $\mu\text{L}$  da solução enzimática e volumes variados da solução de herbicida até atingir a concentração desejada do inibidor no ensaio e na solução-tampão para um volume final de 1 mL. Foram adicionados ao tratamento zero 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M, visando impedir a atividade da enzima. Os valores de absorvância desse tratamento foram descontados dos valores das leituras dos demais. Os resultados da atividade de cada tratamento constituíram a média de três repetições.

Após a pipetagem de todos os reagentes, iniciou-se o primeiro período de incubação por 45 minutos a 30 °C. Interrompeu-se a reação com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 M em cada tubo de ensaio, exceto no controle zero, que já continha o ácido antes da incubação. Iniciou-se, então, a segunda incubação (15 minutos a 60 °C), para a formação da acetoína, formada pela reação do ácido sulfúrico com o acetolactato, formado durante a primeira reação. Depois disso, iniciou-se a reação de formação do complexo colorido. Para isso, foram adicionados 1 mL de uma solução de creatina 0,5% (p/v) e 1 mL de naftol 5% (p/v), preparado em NaOH 2,5 M; essas duas soluções devem ser preparadas somente no momento do uso. Após, a mistura foi

novamente incubada por 15 minutos a 60 °C, para o desenvolvimento da cor, que variou de rosa-clara a vermelha, contrastando com a cor marrom-esverdeada do padrão zero. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e as absorvâncias, lidas em espectrofotômetro a 530 nm. Os valores de absorvância foram corrigidos por meio da subtração do valor do controle zero.

Nos ensaios de inibição com os herbicidas foram calculadas, para todos os tubos, as porcentagens de inibição da atividade da ALS de cada tratamento, considerando-se como 100% de atividade o ensaio realizado sem a presença do inibidor. Os valores obtidos foram usados para calcular o  $I_{50}$ , que representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima.

O teor de proteína, usado para corrigir as leituras, das amostras eluídas da coluna foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### **2.4. Determinação dos parâmetros $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes**

Para obtenção dos valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , os ensaios de atividade enzimática foram realizados com diferentes concentrações de substrato. As concentrações finais de piruvato utilizadas foram 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80; 100; e 160 mM para o biótipo sensível e 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 40; e 60 mM para o resistente. Os demais procedimentos foram idênticos, como já descrito. Os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados, utilizando-se o programa Curve Expert versão 1.24 para Windows.

Os valores de atividade foram expressos em U/mL, em que uma unidade de atividade da acetolactato sintase foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 0,1 unidade de absorvância por minuto.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No primeiro experimento, constatou-se que todos os biótipos oriundos de plantas que nunca receberam herbicidas inibidores da ALS foram altamente

sensíveis ao imazethapyr. Entre os indivíduos oriundos de plantas daquela lavoura, onde se suspeitava estar ocorrendo resistência, foram observados diversos graus de sensibilidade, existindo desde biótipos altamente sensíveis até aqueles que não apresentavam nenhum sintoma em resposta ao tratamento com herbicida. Os diversos níveis de resistência podem ser o resultado de diferentes mutações ocorridas no gene que codifica a enzima e do tipo de alelo do gene (Powles e Preston, 1998). O gene que codifica a enzima ALS, nas espécies resistentes, pode apresentar diferentes mutações, que conferem alterações funcionais nesta enzima, e produzir, dessa forma, plantas resistentes com características distintas (Powles e Preston, 1998). Nesse experimento, foram identificadas 244 plantas insensíveis ao dobro da dose comercial do imazethapyr, correspondendo a 65% da população.

No segundo experimento, as curvas de dose-resposta construídas com os valores de matéria seca produzida pelos biótipos (Figuras 1 a 4) indicaram para o biótipo sensível  $GR_{50}$  de 10,67 g ha<sup>-1</sup> para o imazapyr e de 13,49 g ha<sup>-1</sup> para o imazethapyr (Figuras 1 e 2). Para o biótipo resistente, o  $GR_{50}$  foi de 531,94 g ha<sup>-1</sup> para o imazapyr e de 1.232,02 g ha<sup>-1</sup> para o imazethapyr (Figuras 3 e 4).

Notou-se que foi necessário mais que o dobro da dose de imazethapyr para se ter o mesmo efeito do imazapyr sobre o biótipo resistente. Tal resultado evidencia maior efeito do herbicida imazapyr sobre o biótipo resistente.

No terceiro experimento, os resultados indicaram que, já aos 7 DAT, os herbicidas lactofen, fomesafen, atrazine, cyanazine, glufosinate, glyphosate, sulfosate, paraquat e 2,4-D amina controlaram totalmente o biótipo sensível e o resistente (Tabela 1). Já os herbicidas inibidores da ALS, imazapyr, imazaquin, imazethapyr, imazamox e nicosulfuron apresentaram toxicidade acima de 94% aos 7 DAT e controle total do biótipo sensível aos 14 DAT. No que se refere ao biótipo resistente, constatou-se, aos 7 DAT, que os herbicidas imazapyr e imazamox foram os únicos, dentre os inibidores da ALS, que causaram sintomas de fitotoxicidade: 78 e 9%, respectivamente (Tabela 1).

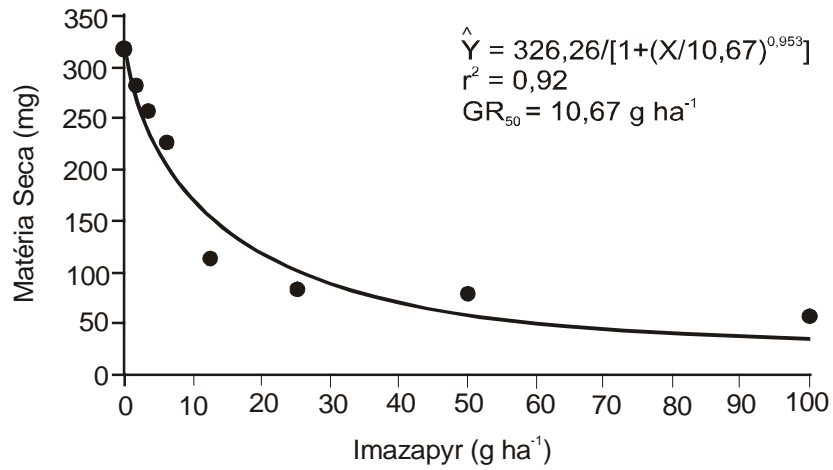


Figura 1 – Estimativa da produção de matéria seca (g por planta) em função da dose de imazapyr (g ha<sup>-1</sup>) para o biótipo sensível de leiteiro.

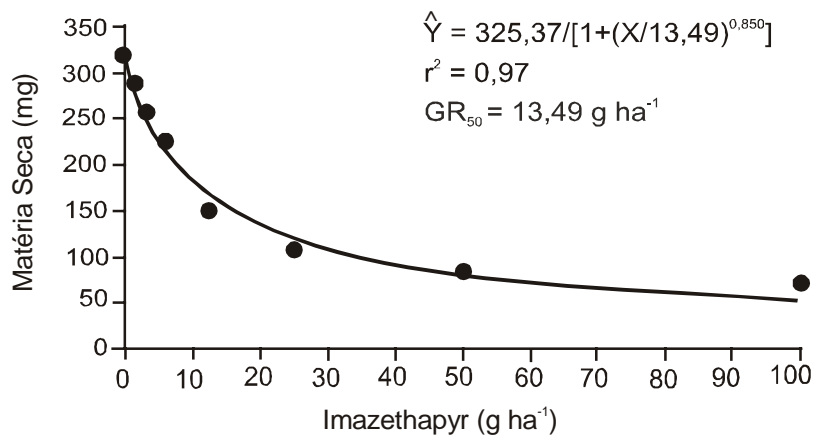


Figura 2 – Estimativa da produção de matéria seca (g por planta) em função da dose de imazethapyr (g ha<sup>-1</sup>) para o biótipo sensível de leiteiro.

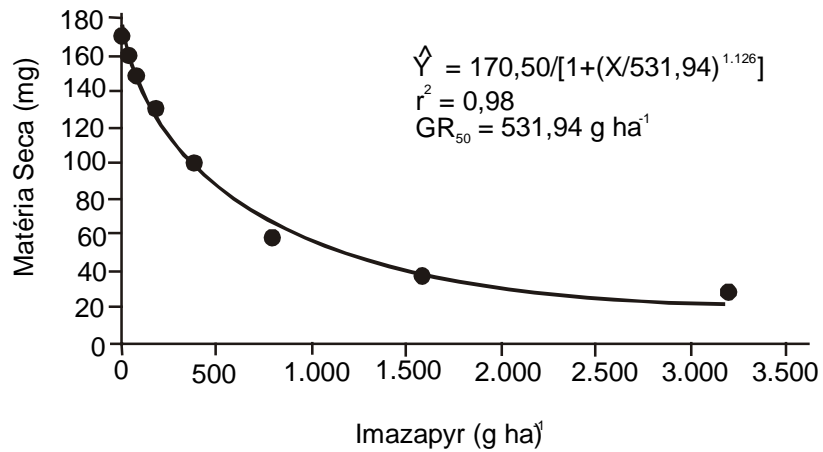


Figura 3 – Estimativa da produção de matéria seca (g por planta) em função da dose de imazapyr (g ha<sup>-1</sup>) para o biótipo resistente de leiteiro.

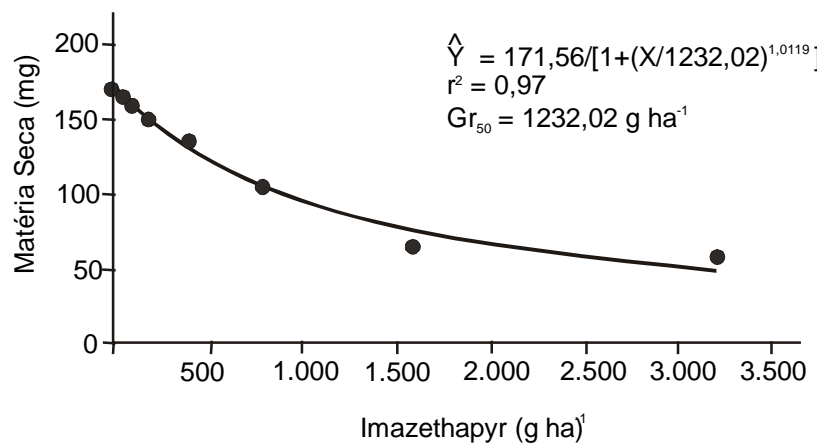


Figura 4 – Estimativa da produção de matéria seca (g por planta) em função da dose de imazethapyr (g ha<sup>-1</sup>) para o biótipo resistente de leiteiro.

Tabela 1 – Resposta de um biótipo de *Euphorbia heterophylla* L. resistente e um sensível a herbicidas com diferentes mecanismos de ação

Tratamento	Dose (g ha <sup>-1</sup> )	Toxicidade aos 7 DAT		Toxicidade aos 14 DAT	
		Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
Lactofen	156	100	100	100	100
Fomesafen	250	100	100	100	100
Atrazine	320	100	100	100	100
Cyanazine	200	100	100	100	100
Glufosinate	400	100	100	100	100
Glyphosate	720	100	100	100	100
Sulfosate	960	100	100	100	100
Paraquat	400	100	100	100	100
2,4-D amina	100	95	96	100	100
Imazapyr	625	97	78	100	86
Imazaquin	150	95	0	100	0
Imazethapyr	100	96	0	100	0
Imazamox	40	99	9	100	14
Nicosulfuron	80	94	0	100	0
Testemunha	0	0	0	0	0
CV(%)		2,3	2,3	0,9	0,9

Escala de avaliação da toxicidade (controle): ótimo = 91-100, muito bom = 81-90, bom = 71-80, regular = 61-70, ruim = 41-60 e muito ruim = 00-40 (ALAM, 1974).

Aos 14 DAT, a fitotoxicidade desses herbicidas aumentou, chegando a 86% no tratamento com imazapyr e 14% com imazamox. O herbicida imazapyr apresentou maior efeito sobre o biótipo resistente do que os demais inibidores da ALS testados, indicando bom controle desse herbicida. A resistência cruzada não confere, necessariamente, resistência a herbicidas de todos os grupos químicos que possuem o mesmo local de ação (Powles & Preston, 1998).

O biótipo resistente não foi afetado pelos demais herbicidas inibidores da ALS testados, sendo totalmente controlado pelos produtos com outros mecanismos de ação, indicando possuir resistência cruzada aos inibidores da ALS.

O estudo da atividade da ALS (formação de produto vs. tempo de reação) apresentou-se linear até 90 minutos de incubação. Assim, quanto maior o tempo de incubação, maior será a quantidade de acetolactato produzida. Desse modo, optou-se por um tempo de 45 minutos, portanto dentro da linearidade e suficiente para obter quantidade adequada de acetolactato para realizar a leitura com segurança.

Nos estudos de inibição da atividade da enzima ALS, constatou-se que aquela extraída do biótipo sensível teve sua atividade altamente inibida por ambos os herbicidas. O  $I_{50}$  para essa enzima foi de 2,08  $\mu\text{M}$  para o imazapyr e de 0,71  $\mu\text{M}$  para o imazethapyr (Figuras 5 e 6). O herbicida imazethapyr demonstrou, assim, maior capacidade inibitória da ALS em plantas de leiteiro sensível do que o imazapyr.

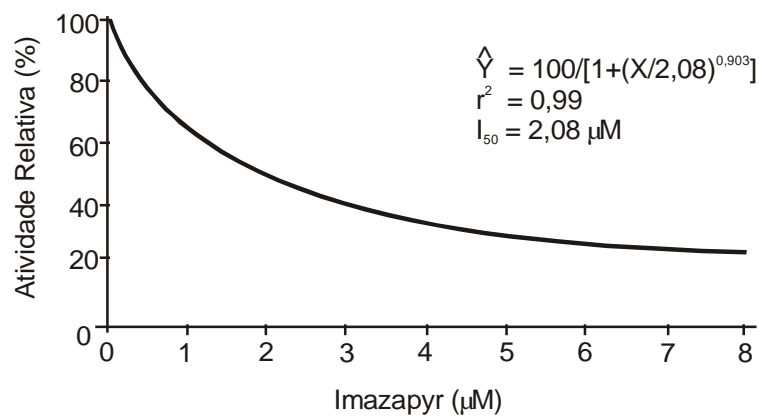


Figura 5 – Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* L. sensível em função das doses crescentes do herbicida imazapyr.

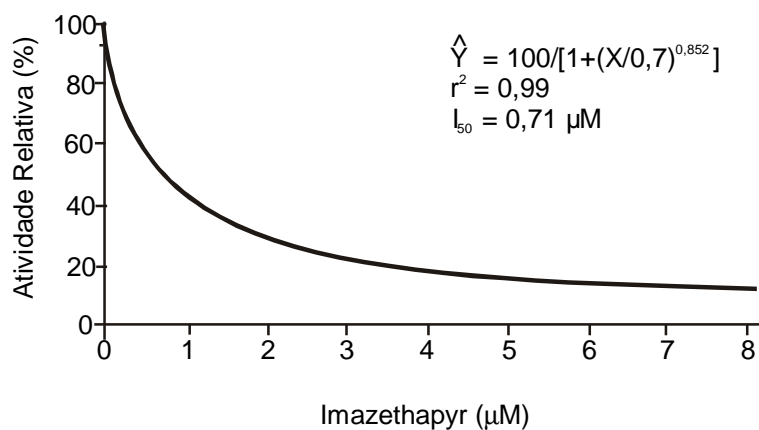


Figura 6 – Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* L. sensível em função das doses crescentes do herbicida imazethapyr.

A atividade da ALS varia entre as espécies e com a idade dos tecidos. Os herbicidas imazapyr e imazethapyr apresentam alto efeito inibitório sobre esta enzima, mas, em geral, o imazethapyr é um inibidor mais potente que o imazapyr. As espécies possuem grandes diferenças de  $I_{50}$  para esses herbicidas, que podem ser atribuídas às variações intrínsecas da ALS e, ou, às diferenças na estabilidade da enzima (Stidham e Singh, 1991). No entanto, a ALS do biótipo resistente mostrou-se pouco sensível aos herbicidas imazapyr e imazethapyr (Figuras 7 e 8). A dose de 3.000  $\mu\text{M}$  de imazapyr e de 2.000  $\mu\text{M}$  de imazethapyr não foram suficientes para inibir 50% da atividade da enzima. Desse modo, o  $I_{50}$  para essa enzima é superior a 3.000  $\mu\text{M}$  para o imazapyr e a 2.000  $\mu\text{M}$  para o imazethapyr.

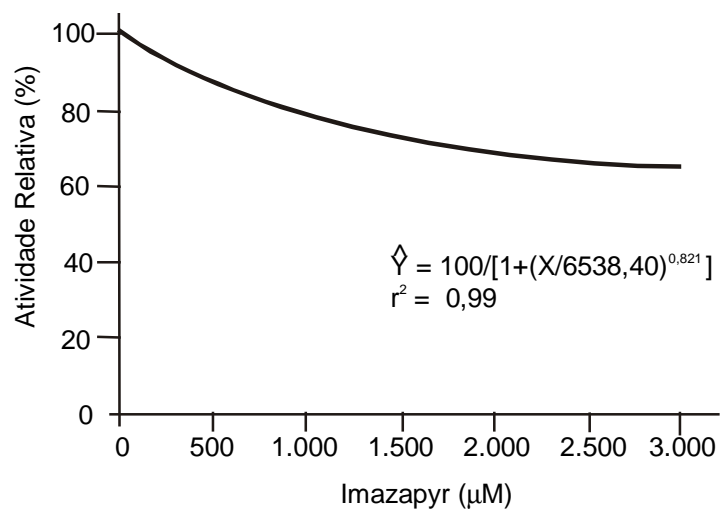


Figura 7 – Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* resistente em função das doses crescentes do herbicida imazapyr.

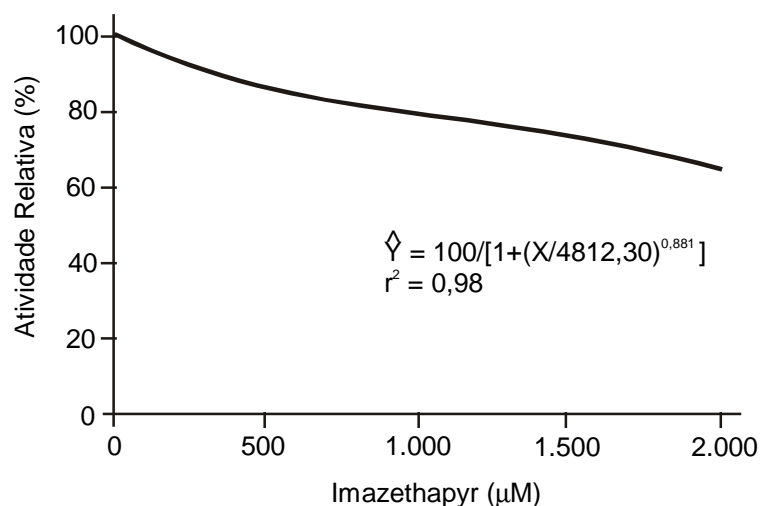


Figura 8 – Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* resistente em função das doses crescentes do herbicida imazethapyr.

Esses resultados evidenciam que a resistência apresentada pelo biótipo de *E. heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da ALS é, provavelmente, devida exclusivamente à insensibilidade da enzima ALS a esses herbicidas.

Em relação aos teores de proteínas, os valores variaram de 23 a 25 mg mL<sup>-1</sup> no extrato enzimático, tanto no sensível quanto no resistente, não sendo, portanto, atribuída a esses teores a causa da variação constatada na atividade da ALS.

Os valores de  $K_M$  da enzima ALS para o piruvato dos biótipos sensíveis e resistentes foram, respectivamente, de 5,05 e 2,26 mM, enquanto o  $V_{m\acute{a}x}$  foi de 0,28 e de 0,16 U/mL, respectivamente (Figuras 9 e 10).

A mutação ocorrida no gene que codifica a enzima ALS não provocou mudança significativa na afinidade da enzima pelo substrato, pois os valores de  $K_M$  estão na mesma ordem de grandeza. Entretanto, a eficiência da enzima foi alterada, uma vez que houve aumento de 75% no valor do  $V_{m\acute{a}x}$ . A enzima ALS do biótipo resistente apresenta  $V_{m\acute{a}x}$  inferior ao observado para a ALS do biótipo sensível. Essa diferença é atribuída à provável mutação ocorrida no gene que codifica a ALS, que proporcionou a origem de um biótipo resistente, porém com a enzima ALS apresentando o parâmetro cinético  $V_{m\acute{a}x}$  menor.

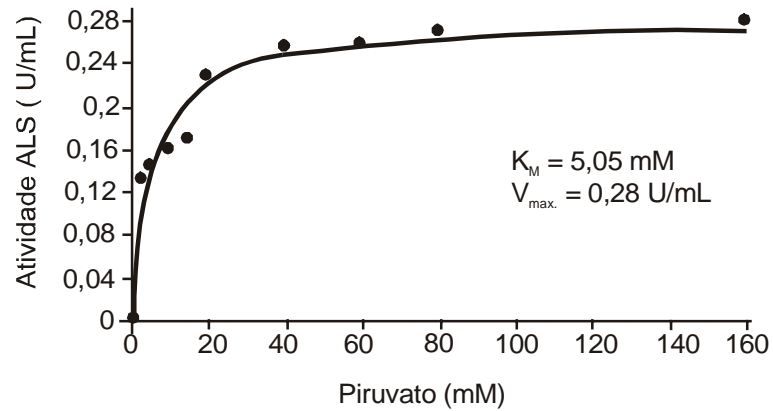


Figura 9 – Atividade da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* L. sensível em função das diferentes concentrações de piruvato.

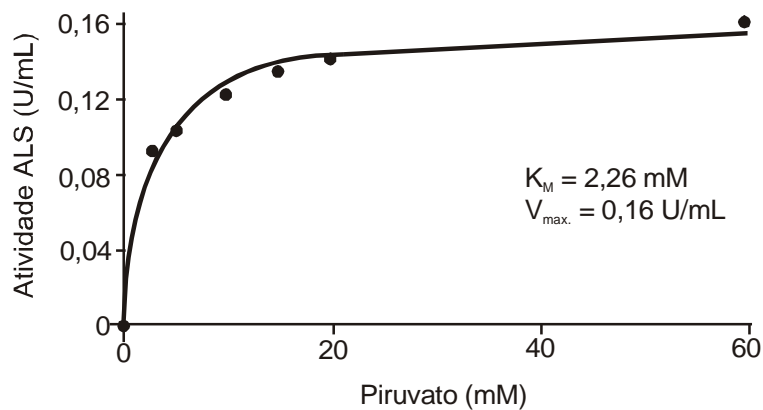


Figura 10 – Atividade da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* L. resistente em função das diferentes concentrações de piruvato.

Com base nesses resultados, levanta-se a hipótese de que a mutação provocou alteração na enzima ALS que não modificou, de maneira significativa, a sua afinidade pelo substrato. Entretanto, a eficiência de conversão do piruvato em acetolactato foi afetada, uma vez que o valor de  $V_{\max}$  da ALS mutada foi significativamente menor que o da enzima sensível.

#### 4. CONCLUSÕES

– Foi confirmada a presença de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos inibidores da ALS em lavouras de soja no Município de Ernestina, RS.

– O GR<sub>50</sub> para o biótipo sensível foi de 10,67 g ha<sup>-1</sup> para o imazapyr e de 13,49 para o imazethapyr, e o do biótipo resistente foi de 531,94 g ha<sup>-1</sup> para o imazapyr e de 1.232,02 g ha<sup>-1</sup> para o imazethapyr.

– O biótipo resistente mostrou-se sensível a herbicidas com outros mecanismos de ação, indicando possuir resistência cruzada.

– O herbicida imazapyr apresentou maior atividade sobre o biótipo resistente do que os demais inibidores da ALS testados.

– O I<sub>50</sub> da enzima ALS do biótipo sensível foi de 2,08 µM para o imazapyr e de 0,71 µM para o imazethapyr, e o do resistente foi acima de 3.000 µM para o imazapyr e de 2.000 µM para o imazethapyr.

– A resistência dos biótipos de *E. heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da ALS é atribuída à insensibilidade desta enzima a tais herbicidas.

– Não houve mudança significativa na afinidade da enzima ALS pelo substrato, entretanto a eficiência da enzima resistente foi alterada, uma vez que houve aumento de 75% no valor do V<sub>máx</sub>.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTS, K.J.; EHLKE, N.J.; WYSE, D.L.; GRONWALD, J.W.; SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**, Champaign, v.40, n.2, p.184-189, 1992.

CAREY, J.B.; PENNER, D.; KELLS, J. Physiological basis for nicosulfuron and primisulfuron selectivity in five plant species. **Weed science**, Champaign, v.1, n.45, p.22-30, 1997.

HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: **HERBICIDE ACTION COURSE**, 1994. Summary of lectures. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.

- HOLT, J.S. & LEBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.141-149, 1990.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal chemical**, v.193, p.265-275, 1951.
- PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* L. a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
- POWLES, S.B. & PRESTON, C. **Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants**. 1998. Web: [Http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/mono2.htm](http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/mono2.htm), 26p.
- STIDHAM, M.A. & SINGH, B.K. Imidazolinone-Acetoxyacid synthase interactions. In: SHANER, D.L. & O’CONNOR, S.L. **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.71-90.

## CONTROLE QUÍMICO DE *Euphorbia heterophylla* L. RESISTENTE A HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS

### RESUMO

A resistência do leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) aos herbicidas inibidores da ALS traz a necessidade da investigação da resposta dos genótipos resistentes a herbicidas com diferentes mecanismos de ação. O objetivo deste trabalho foi avaliar herbicidas alternativos para controle dos biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos inibidores da ALS. Os tratamentos herbicidas constaram dos princípios ativos imazaquin (120 e 150 g ha<sup>-1</sup>), imazethapyr (75 e 100 g ha<sup>-1</sup>), flumetsulan (60 e 120 g ha<sup>-1</sup>), flumioxazin (45 e 60 g ha<sup>-1</sup>) e sulfentrazone (300 e 600 g ha<sup>-1</sup>) aplicados em pré-emergência e imazethapyr (80 e 100 g ha<sup>-1</sup>), imazamox (30 e 40 g ha<sup>-1</sup>), imazapyr (20 e 250 g ha<sup>-1</sup>), lactofen (48 e 156 g ha<sup>-1</sup>), fomesafen (136 e 250 g ha<sup>-1</sup>) e glyphosate (600 e 720 g ha<sup>-1</sup>) aplicados em pós-emergência, de forma isolada e combinada, sobre um biótipo de leiteiro resistente e um sensível aos inibidores da ALS. Acrescentou-se ainda uma testemunha sem tratamento com herbicida para cada biótipo. Os herbicidas inibidores da ALS controlaram com eficiência o biótipo sensível, com exceção do flumetsulan; já sobre o biótipo resistente somente o herbicida imazapyr, na maior dose, apresentou controle. Os herbicidas com mecanismo de ação distinto dos inibidores da ALS apresentaram-se altamente eficientes no controle dos biótipos resistentes e sensíveis, quando aplicados de forma isolada ou em mistura. Portanto, os biótipos resistentes de *Euphorbia heterophylla* L. são controlados eficientemente por herbicidas com mecanismos de ação distintos dos inibidores da ALS.

**Termos de indexação:** resistência a herbicidas, controle alternativo, acetolactato sintase e mecanismo de ação.

## CHEMICAL CONTROL OF *Euphorbia heterophylla* L. BYOTIPES RESISTANT TO HERBICIDES INHIBITORS OF ALS

### ABSTRACT

The resistance of wild pointsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) to ALS-inhibitors leads to the need of investigation into the response of resistant genotypes to herbicides with different action mechanisms. The objective of this study was to evaluate alternative herbicides for the control of *Euphorbia heterophylla* L. biotypes resistant to ALS-inhibitors. The herbicide treatments consisted of imazaquin (120 and 150g ha<sup>-1</sup>), imazethapyr (7 and 100g ha<sup>-1</sup>), flumetsulan (60 and 120g ha<sup>-1</sup>), flumioxazin (45 and 60g ha<sup>-1</sup>) and sulfentrazone (300 and 600g ha<sup>-1</sup>), which were applied at pre-emergence stage, and imazetapyr (80 and 100g ha<sup>-1</sup>), imazamox (30 and 40g ha<sup>-1</sup>), imazapyr (20 and 250 g ha<sup>-1</sup>), lactofen (48 and 156g ha<sup>-1</sup>), fomesafen (136 and 250g ha<sup>-1</sup>) and glyphosate (600 and 720g ha<sup>-1</sup>), applied after emergence in isolated as well as in combined form on a ALS-inhibitor-resistant and a sensitive biotype of *Euphorbia heterophylla* L. For each biotype there was an additional witness without herbicide treatment. The ALS-inhibitor herbicides controlled the sensitive biotype efficiently, except for flumetsulan, while the resistant biotype could only be controlled by the imazapyr herbicide in higher doses. Herbicides with other action mechanisms proved to be highly efficient for the control of sensitive and resistant biotypes when applied in isolated or mixed form. Resistant *Euphorbia heterophylla* L. biotypes are therefore efficiently controlled by other action mechanisms than ALS-inhibitors.

**Key-words:** Herbicide resistance, alternative control, Acetolactate synthase, action mechanism.

## 1. INTRODUÇÃO

A constatação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas começou em 1960 no Estado de Washington (EUA), com a descoberta da resistência de *Senecio vulgaris* à simazina (Ryan, 1970). Estudos posteriores evidenciaram que essa espécie era resistente a todas as triazinas, devido a uma mutação no genoma dos cloroplastos (Radosevick et al., 1979). Posteriormente, várias outras espécies com resistência a triazinas foram descritas, a exemplo daquelas dos gêneros *Amaranthus* e *Chenopodium* em diferentes países (Radosevick, 1977). Em 1985, foi relatada na Inglaterra a ocorrência de resistência de *Alopecurus myosuroides* ao chlortoluron, herbicida do grupo das uréias substituídas. Alguns biótipos dessa espécie apresentam resistência cruzada ao diclofop, ao pendimethalin e a muitas triazinas; entretanto, não são resistentes a muitos compostos similares a esses (Moss, 1990). O desenvolvimento de resistência cruzada em biótipos de *Lolium rigidum* é um grande problema na Austrália (Powles & Howat, 1990). Resistência cruzada é definida como a capacidade desenvolvida por biótipos de plantas daninhas de exibir resistência a herbicidas diferentes quimicamente, mas com mesmo mecanismo de ação (Powles & Howat, 1990).

No Brasil, o primeiro caso de resistência relatado foi de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS, porém herbicidas alternativos como sulfentrazone, bentazon, lactofem, fomesafem e acifluorfen controlam eficientemente esses biótipos (Ponchio, 1997). Todas as plantas daninhas resistentes a um inibidor de ALS também são resistentes a outros herbicidas inibidores da mesma enzima (Powles & Holtum, 1994). Um biótipo de *Lactuca serriola* resistente à mistura de chlorsulfuron/metsulfuron é resistente a outras sulfoniluréias; resiste às imidazolinonas imazpyr e imazethapyr, mas não ao imazaquin (Mallory-Smith et al., 1990). Plantas resistentes aos inibidores da ALS são sensíveis a herbicidas com diferentes modos de ação (Primiani et al., 1990).

O leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) é uma planta daninha anual que ocorre no Brasil de norte a sul. É uma infestante com alta capacidade competitiva, com rápido crescimento e multiplicação (Kissmann & Groth, 1992).

O controle dessa espécie em lavouras de soja é realizado com o emprego de herbicidas, principalmente aqueles pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas. O mecanismo de ação desse grupo herbicida é através da inibição da enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS), que atua na rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Hess, 1994).

Em algumas lavouras de soja, na Região Sul do Brasil, estão sendo encontrados biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. Essas plantas estão se multiplicando rapidamente, e novos casos estão surgindo. Desse modo, é importante que se busquem alternativas de controle dessa espécie para controlar as plantas resistentes e impedir o surgimento de novos casos. O uso de herbicidas alternativos e de misturas de herbicidas com diferentes mecanismos de ação constitui algumas alternativas para controle em curto prazo e redução da pressão de seleção (Christoffoleti et al., 1994), prevenindo o surgimento da resistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar herbicidas alternativos para controle dos biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos inibidores da ALS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos, em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, no ano de 1997, dois experimentos, o primeiro com herbicidas pré-emergentes e o segundo com herbicidas pós-emergentes.

No primeiro experimento, para avaliar herbicidas pré-emergentes, foram semeadas, numa linha, 20 sementes do biótipo sensível e, em outra, 20 do biótipo resistente, em uma bandeja com capacidade para 10 L. Os tratamentos herbicidas constaram dos princípios ativos imazaquin (120 e 150 g ha<sup>-1</sup>), imazethapyr (75 e 100 g ha<sup>-1</sup>), flumetsulan (60 e 120 g ha<sup>-1</sup>), flumioxazin (45 e 60 g ha<sup>-1</sup>) e sulfentrazone (300 e 600 g ha<sup>-1</sup>). A maior dose de cada herbicida foi aplicada de forma isolada e a menor, de forma isolada e combinada, sobre um biótipo de leiteiro resistente e um sensível aos inibidores da ALS.

Acrescentou-se, ainda, uma testemunha (sem tratamento com herbicida) para cada biótipo. Os tratamentos foram aplicados imediatamente após a semeadura.

No segundo experimento, em que se testaram os herbicidas pós-emergentes, foram semeadas seis sementes de leiteiro em vaso com capacidade para 300 mL. Após a emergência das plantas, foi procedido o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

Os tratamentos herbicidas constaram dos princípios ativos: imazethapyr (80 e 100 g ha<sup>-1</sup>), imazamox (30 e 40 g ha<sup>-1</sup>), imazapyr (20 e 250 g ha<sup>-1</sup>), lactofen (48 e 156 g ha<sup>-1</sup>), fomesafen (136 e 250 g ha<sup>-1</sup>) e glyphosate (600 e 720 g ha<sup>-1</sup>). A maior dose de cada herbicida foi aplicada de forma isolada e a menor, de forma isolada e combinada, sobre um biótipo de leiteiro resistente e um sensível aos inibidores da ALS. Acrescentou-se, ainda, uma testemunha (sem tratamento com herbicida) para cada biótipo. Os tratamentos foram aplicados quando a maioria das plantas atingiu o estágio de 3-4 folhas.

O delineamento experimental usado em ambos os experimentos foi completamente casualizado, com três repetições para cada tratamento. Os tratamentos herbicidas foram aspergidos com aspersor costal de precisão e volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>.

A toxicidade provocada pelos tratamentos herbicidas foi avaliada aos 7, 14 e 28 DAT (dias após o tratamento), utilizando-se escala percentual, em que nota zero significou nenhum efeito de dano às plantas e nota 100 representou morte ou completa supressão destas.

Os resultados de toxicidade foram transformados em nível de controle, o que gerou a seguinte escala: ótimo = 90-100, muito bom = 81-90, bom = 71-80, regular = 61-70, ruim = 41-60 e muito ruim = 00-40 (ALAM, 1974).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No primeiro experimento, com os herbicidas aplicados em pré-emergência, o biótipo sensível foi, aos 7 DAT, controlado com eficiência por todos os tratamentos, exceto por aquele que continha o flumetsulan de forma isolada ou combinada com imazaquin (Tabela 1). Para esses tratamentos, o

Tabela 1 – Toxicidade de herbicidas aos 7, 14 e 28 DAT (dias após a aplicação do tratamento), com diferentes mecanismos de ação, aplicados isolados e combinados em pré-emergência em *Euphorbia heterophylla* L. resistente (R) e sensível (S) a herbicidas inibidores da ALS

Tratamentos	g.i.a.ha <sup>-1</sup>	Toxicidade aos 7 DAT (%)		Toxicidade aos 14 DAT (%)		Toxicidade aos 28 DAT (%)	
		S	R	S	R	S	R
Testemunha	0	0	0	0	0	0	0
Imazaquin	120	80	0	82	0	89	0
Imazaquin	150	93	0	95	0	90	0
Imazethapyr	75	93	0	96	0	95	0
Imazethapyr	100	93	0	97	0	96	0
Flumetsulan	60	55	0	62	0	55	0
Flumetsulan	120	56	0	63	0	68	0
Flumioxazin	45	100	100	100	100	100	100
Flumioxazin	60	100	100	100	100	100	100
Sulfentrazone	300	100	100	100	100	100	100
Sulfentrazone	600	100	100	100	100	100	100
Imazaquin + imazethapyr	120 + 75	95	0	98	0	100	0
Imazaquin + flumetsulan	120 + 60	68	0	63	0	45	0
Imazaquin + flumioxazin	120 + 45	100	100	100	100	100	100
Imazaquin + sulfentrazone	120 + 300	100	100	100	100	100	100
Imazethapyr + flumetsulan	75 + 60	93	0	96	0	90	0
Imazethapyr + flumioxazin	75 + 45	100	100	100	100	100	100
Imazethapyr + sulfentrazone	75 + 300	100	100	100	100	100	100
Flumetsulan + flumioxazin	60 + 45	100	100	100	100	100	100
Flumetsulan + sulfentrazone	60 + 300	100	100	100	100	100	100
Flumioxazin + sulfentrazone	45 + 300	100	100	100	100	100	100

Escala de avaliação da toxicidade (controle): ótimo = 90-100, muito bom = 81-90, bom = 71-80, regular = 61-70, ruim = 41-60 e muito ruim = 00-40 (ALAM, 1974).

controle foi de ruim a regular, já que o nível de toxicidade não ultrapassou 68% em nenhuma das avaliações. No entanto, o biótipo resistente não manifestou sintomas de toxicidade em resposta à aplicação isolada ou à mistura de herbicidas inibidores da enzima ALS (Tabela 1). No entanto, quando foram misturados aos inibidores da ALS herbicidas com outros mecanismos de ação, o controle do biótipo resistente foi ótimo já aos 7 DAT. Esse controle foi atribuído aos herbicidas com mecanismos distintos daqueles dos inibidores da ALS, já que esses herbicidas apresentaram o mesmo nível de controle do biótipo resistente quando foram aplicados isolados em ambas as doses empregadas.

Os herbicidas aplicados em pós-emergência (Tabela 2) apresentaram nível máximo de controle já aos 7 DAT sobre o biótipo sensível. O biótipo resistente apresentou níveis diferenciados de toxicidade em resposta aos tratamentos com herbicidas inibidores da ALS (Tabela 2). O imazethapyr não provocou sintomas de toxicidade nas plantas em nenhuma das avaliações. O imazamox causou toxicidade de 14 e 18%, para a menor e a maior dose, respectivamente, aos 7 DAT; de 16 e 27%, aos 14 DAT; e de 15 e 31%, aos 28 DAT, indicando nível muito ruim de controle. Já a maior dose do herbicida imazapyr apresentou controle ótimo, com danos de 91 e 95% aos 7 e 28 DAT, respectivamente, ao passo que a menor dose não provocou sintomas de toxicidade. Os demais herbicidas controlaram totalmente o biótipo resistente, independentemente da dose ou de serem aplicados de forma isolada ou em mistura.

Desse modo, os biótipos sensíveis demonstram ser facilmente controlados tanto por herbicidas inibidores da ALS quanto por herbicidas com outros mecanismos de ação. Já o biótipo resistente mostrou-se sensível a herbicidas com mecanismo de ação distinto daquele dos inibidores da ALS, concordando com Premiani et al. (1990) e Ponchio (1997), que relataram a sensibilidade de plantas resistentes aos inibidores da ALS a outros mecanismos de ação herbicida. Com relação aos inibidores da ALS, o biótipo resistente mostrou não ser afetado por esses produtos, exceto pelo imazapyr, que na dose de 250 g ha<sup>-1</sup> apresentou controle ótimo. Esses resultados evidenciaram que o biótipo resistente possui resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS testados, exceto ao imazapyr.

Tabela 2 – Toxicidade de herbicidas aos 7, 14 e 28 DAT (dias após a aplicação do tratamento), com diferentes mecanismos de ação, aplicados isolados e combinados em pós-emergência em *Euphorbia heterophylla* L. resistente (R) e sensível (S) a herbicidas inibidores da ALS

Tratamento <sup>1</sup>	g ha <sup>-1</sup>	Toxic. aos 7 DAT (%)		Toxic. aos 14 DAT (%)		Toxic. aos 28 DAT (%)	
		S	R	S	R	S	R
Testemunha	0	0	0	0	0	0	0
Imazethapyr	80	100	0	100	0	100	0
Imazethapyr	100	100	0	100	0	100	0
Imazamox	30	100	14	100	16	100	15
Imazamox	40	100	18	100	27	100	31
Imazapyr	20	100	5	100	0	100	0
Imazapyr	250	100	91	100	89	100	95
Fomesafen	136	100	100	100	100	100	100
Fomesafen	250	100	100	100	100	100	100
Lactofen	48	100	100	100	100	100	100
Lactofen	156	100	100	100	100	100	100
Glyphosate	600	100	100	100	100	100	100
Glyphosate	720	100	100	100	100	100	100
Imazethapyr + imazamox	80 + 30	100	17	100	33	100	27
Imazethapyr + imazapyr	80 + 20	100	4	100	0	100	0
Imazethapyr + fomesafen	80 + 136	100	100	100	100	100	100
Imazethapyr + lactofen	80 + 48	100	100	100	100	100	100
Imazethapyr + glyphosate	80 + 600	100	100	100	100	100	100
Imazamox + imazapyr	30 + 20	100	0	100	0	100	0
Imazamox + fomesafen	30 + 136	100	100	100	100	100	100
Imazamox + lactofen	30 + 48	100	100	100	100	100	100
Imazamox + glyphosate	30 + 600	100	100	100	100	100	100
Imazapyr + fomesafen	20 + 136	100	100	100	100	100	100
Imazapyr + lactofen	20 + 48	100	100	100	100	100	100
Imazapyr + glyphosate	20 + 600	100	100	100	100	100	100
Fomesafen + lactofen	136 + 48	100	100	100	100	100	100
Fomesafen + glyphosate	136 + 600	100	100	100	100	100	100
Lactofen + glyphosate	48 + 600	100	100	100	100	100	100

<sup>1</sup> Ao tratamento com imazamox, adicionou-se Cicol 0,125% e aos tratamentos com lactofen e fomesafen, Energic 0,2%.

Escala de avaliação da toxicidade (controle): ótimo = 90-100, muito bom = 81-90, bom = 71-80, regular = 61-70, ruim = 41-60 e muito ruim = 00-40 (ALAM, 1974).

A resistência cruzada não confere necessariamente resistência a todos os grupos de herbicidas que agem sobre o mesmo local. Mallory-Smith et al. (1990) relataram que um biótipo de *Lactuca serriola* é resistente ao imazapyr e ao imazethapyr, mas é sensível ao imazaquin. Biótipos de *Lolium rigidum* e *Kochia scoparia*, que possuem resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS, apresentam diferentes níveis de resistência aos diferentes grupos de herbicidas que agem inibindo essa enzima. Isso se deve a pequenas diferenças na ligação entre a enzima e a molécula herbicida e às diferentes mutações que ocorrem no gene que codifica a enzima ALS (Powles e Preston, 1998).

#### 4. CONCLUSÃO

- O biótipo resistente apresenta resistência cruzada aos inibidores da ALS testados, exceto ao imazapyr, e é sensível a herbicidas com outros mecanismos de ação, aplicados de forma isolada ou combinada (mistura).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM – Asociación Latinoamericana de Malezas. **Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas**, Bogotá, v.1, n.1, p.35-38, 1974.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTÓRIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.12, n.1, p.13-20, 1994.
- HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: **HERBICIDE ACTION COURSE**, 1994. **Summary of lectures**. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.
- KISMANN, K.G. & GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 1992. 798p.
- MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; DIAL, M.J. Identification of sulfonylureas herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.163-168, 1990.

- MOSS, S.R. Herbicide cross-resistance in slender foxtail (*Alopecurus myosuroides*). **Weed science**, Champaign, v.38, n.6, p.492-496, 1990.
- PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* L. a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS**. Piracicaba-SP: ESALQ, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
- POWLES, S.B. & HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994. 353p.
- POWLES, S.B. & HOWAT, P.D. Herbicide-resistant weeds in Austrália. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.178-185, 1990.
- PRIMIANI, M.M.; COTTERMAN, J.C.; SAARI, L.L. Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonilurea and imidazolinone herbicides. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.169-172, 1990.
- RADOSEVICK, S.R. Mechanism of atrazine resistance in lambsquarters and pigweed. **Weed science**, Champaign, v.25, n.4, p.316-318, 1977.
- RADOSEVICK, S.R.; STEINBACK, K.E.; ARNTZEN, C.J. Effects of photosystem II inhibitors on thylakoid membranes of two common groundsel (*Senecio vulgaris*) biotypes. **Weed science**, Champaign, v.27, n.2, p.216-218, 1979.
- RYAN, G. F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. **Weed science**, Champaign, v.18, n.5, p.614-616, 1970.

## TÉCNICA DE CRUZAMENTOS CONTROLADOS EM *Euphorbia heterophylla* L.

### RESUMO

O leiteiro, *Euphorbia heterophylla* L., é uma planta daninha comum no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. O controle químico dessa espécie é realizado principalmente com herbicidas que agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS). Contudo, nos últimos anos, vêm sendo observados genótipos resistentes em diversas lavouras da Região Sul. Até o momento, não foram realizados estudos sobre as características genéticas dessa resistência. Este trabalho teve como objetivo descrever uma técnica de cruzamento controlado em *Euphorbia heterophylla* L., para viabilizar futuros estudos genéticos. Foram realizadas hibridações controladas em diversas fases do desenvolvimento do botão floral das plantas. As polinizações e emascações realizadas no estágio 1 (quando as flores femininas apresentam estiletos separados, eretos e com coloração avermelhada e ovário incluso no ciátio) produzem grande número de ciátios com uma ou duas sementes e raramente com três. As realizadas no estágio 2 (momento em que os estiletos estão separados e pouco reflexos sobre o ciátio, com alteração da coloração avermelhada para branca, com a extremidade bifurcada, e ovário ainda incluso no ciátio), ou acima deste, garantiram o sucesso dos cruzamentos com boa produção de sementes.

**Termos de indexação:** hibridação, biologia floral e ciátio.

## CROSSING TECHNIQUE IN *Euphorbia heterophylla* L.

### ABSTRACT

*Euphorbia heterophylla* L. is a common weed in the south, southeast and central west of Brazil. Chemical control is mainly done with herbicides that inhibit the enzyme Acetolactate Synthase (ALS). However, resistant individuals have been observed in several farms of the South. There is no information about the genetic control of such resistance. The present work was aimed to study the hybridization technique in *Euphorbia heterophylla* L. It was studied the anatomy and the organogenesis of different individuals. Controlled emasculations and pollinations carried out in the stage 1 (when the flowers present separate styles, erect and red, and ovary inside of the cyathium) produce great number of cyathium with one or two seeds and rarely three. The hybridizations carried out in the stage 2 (when the styles are separate and little reflex on the cyathium, turning from red to white, with the forked extremity, and ovary still included in the cyathium) or beyond this, do not affect the success of the hybridizations and the number of seeds.

**Index terms:** Hybridization, flower biology, cyathium.

## 1. INTRODUÇÃO

O leiteiro, *Euphorbia heterophylla* L., é uma planta daninha comum no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. É uma espécie nativa nas regiões tropicais e subtropicais das américas (Cronquist, 1981). Apresenta ciclo anual, porte médio de 40-60 cm; é altamente competitivo, com rápido crescimento e multiplicação. O caule é simples ou ramificado, apresentando nodificações em intervalos regulares. As folhas são alternas, opostas ou verticiladas e ocorrem tanto no caule como nos ramos, havendo na parte final dos ramos, abaixo da inflorescência, concentração de folhas (Cronquist, 1981; Kissmann & Groth, 1992).

A flor é uma estrutura bissexual chamada ciátio (Cronquist, 1981). Na inflorescência, localizada na parte terminal do caule e dos ramos, desenvolvem-se conjuntos de ciátios. Estes são involúcros obovóides com cerca de 2,5 mm de comprimento, formado por brácteas fusionadas, abertas na parte superior. Cada ciátio abriga 30 a 40 flores masculinas e apenas uma flor feminina, que é constituída pelo ovário, coroado por estiletos fendidos até a metade e apoiado sobre grosso pedicelo, que, após a fecundação, se alonga posicionando o fruto de forma pendente ao lado do involúcro. A flor masculina é formada por um estame, articulado no pedicelo. Os estames circundam a flor feminina (Kissmann & Groth, 1992). O sistema de reprodução pode ser tanto por autofecundação como por fecundação cruzada (Cronquist, 1981; Barroso, 1984; Ingrouille, 1992), caracterizando-se como uma espécie autógama com freqüente alogamia.

O fruto, à medida que amadurece, vai tendo a cor alterada e, quando atinge a plena maturação, apresenta deiscência explosiva, lançando as sementes para longe da planta-mãe (Barroso, 1984).

As sementes podem ter formas globosas, ovóides, cônicas, mais ou menos angulares, com 2,5 a 3 mm de comprimento por 2,5 mm de largura. Apresentam dois cotilédones e testa escura, marmorada ou não (Cronquist, 1981; Barroso, 1984; Kissmann & Groth, 1992). As sementes são produzidas em grande quantidade e com pouca dormência. A causa da dormência não é conhecida, mas luz, aliada a temperaturas alternadas de 25 a 35 °C, estimula a

germinação (Kissmann & Groth, 1992). As sementes germinam facilmente a uma profundidade de 4 cm, e em lavouras de soja no Rio Grande do Sul e Paraná ocorre germinação escalonada (Kissmann & Groth, 1992).

O ciclo da *Euphorbia heterophylla* L. é curto, sendo possível duas a três gerações em um ano. Essa espécie desenvolve-se bem em quase todos os tipos de solo, preferindo, no entanto, solos férteis e bem drenados. A via fotossintética do leiteiro é  $C_4$  e o número cromossômico básico,  $2n=32$  (Kissmann & Groth, 1992).

Nos últimos anos, vêm sendo observados genótipos de leiteiro resistentes em diversas lavouras no Estado do Rio Grande do Sul. A vasta área infestada pelo leiteiro e o uso repetido de herbicidas altamente específicos com mesmo mecanismo de ação para seu controle podem ter criado situação favorável à seleção desses genótipos resistentes. A maior questão ecológica, associada à evolução da resistência aos herbicidas, envolve o entendimento das relações entre adaptação, frequência gênica, herança e fluxo gênico (Maxwell & Mortimer, 1994).

O desenvolvimento das técnicas de cruzamento e emasculação é fundamental para futuros estudos genéticos com o leiteiro, o que constituiu o objetivo deste trabalho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em vasos, em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. O bloco de cruzamentos conteve 10 plantas, sendo cinco do genitor masculino e cinco do genitor feminino. Para garantir a disponibilidade de pólen e flores receptivas no momento dos cruzamentos, realizaram-se duas semeaduras dos genitores, com intervalo de uma semana. Os genitores foram mantidos separados, cada grupo em uma casa de vegetação, para evitar polinizações indesejadas.

Foram semeadas quatro sementes por vaso, contendo 3 kg de solo adubado, as quais foram submetidas a tratamento para quebra da dormência, cinco dias a 4-5 °C, em geladeira. Após a emergência, realizou-se o desbaste,

ficando uma planta por vaso, o que favoreceu o desenvolvimento de plantas ramificadas com até nove inflorescências.

Por meio de observações prévias, determinaram-se quatro estádios da flor a serem estudados (Figura 1), durante os quais se procedia às polinizações, transferindo-se o pólen das anteras do genitor masculino, com uso de pinça ou pincel, para o estigma da flor do genitor feminino. Nos estádios 1 e 2, devido ao pequeno tamanho das estruturas florais, as emascações foram realizadas de dois a três dias após as polinizações, enquanto nos demais estádios elas antecederam as polinizações.

O processo de emascação consistiu a retirada do involúcro, formado pelas brácteas fusionadas mais as flores masculinas, restando apenas a flor feminina. Após as polinizações e emascações, realizadas nos estádios anteriores ao 3, foram feitas três vistorias diárias, para eliminação de novos estames, que eram emitidos, uma vez que, nesses estádios, não era possível a eliminação completa dos estames.

Depois de realizados os cruzamentos e as emascações, as inflorescências foram protegidas com saco plástico transparente, perfurado com agulha, para evitar acúmulo de umidade no seu interior, envolvendo a inflorescência e as folhas da sua base. O saco plástico é importante por permitir a entrada da luz para as folhas da base da inflorescência que parecem ter grande importância na formação das sementes.

A coleta dos ciátios usados nos cruzamentos foi realizada no final do ciclo, quando iniciou a mudança da cor verde para marrom. Foram colocados para secar ao sol e acondicionados em envelopes de papel para liberação das sementes, que, posteriormente, foram limpas, acondicionadas em novos envelopes de papel e armazenadas em câmara seca à temperatura de 10 °C e umidade relativa de 60-70%.



Figura 1 – Estádios de desenvolvimento floral de *Euphorbia heterophylla* L.: 1 – Flores femininas apresentando estiletes separados, eretos e com coloração avermelhada; ovário incluído no cíatío; 2 – Estiletes separados e pouco reflexos sobre o cíatío, com alteração da coloração avermelhada para branca, com a extremidade bifurcada; ovário ainda incluído no cíatío; 3 – Estiletes separados e reflexos apresentam coloração branca com brilho intenso; porção apical do ovário exposta; 4 – Os estigmas apresentam coloração branca com brilho intenso, ovário totalmente exposto, emissão das primeiras flores masculinas; 5 – Esquema de um cíatío; e 6 – Um cíatío no estágio 3, antes e depois da emasculação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que não houve necessidade de se proceder à semeadura escalonada, devido ao longo período de emissão floral do leiteiro.

Os cruzamentos devem ser realizados a partir do estágio 2 (Tabela 1), quando os estigmas passam da coloração avermelhada para branca (Figura 1). Os resultados indicaram que as polinizações realizadas no estágio 1, além de apresentarem a menor percentagem de formação de frutos, também proporcionaram a maioria dos ciátios com uma ou duas sementes e raramente com três, enquanto as realizadas após esse estágio propiciaram somente ciátios com três sementes. Considerando também que os estigmas passam de coloração avermelhada para branca a partir do estágio 2, pode-se supor que este seja o momento em que eles se tornam receptivos ao polén.

Tabela 1 – Número de frutos e sementes formados, após hibridações controladas, em diferentes estádios de desenvolvimento floral de *Euphorbia heterophylla* L.

Estádio	Número de Flores	Frutos		Sementes Formadas por Ciátio			Total de Sementes Formadas
		Número	%	1	2	3	
1	50	38	76	15	18	5	66
2	50	48	96	0	0	48	144
3	50	46	92	0	0	46	138
4	50	49	98	0	0	49	147

1 – Flores femininas apresentando estiletes separados, eretos e com coloração avermelhada; ovário incluso no ciátio; 2 – Estiletes separados e pouco reflexos sobre o ciátio, com alteração da coloração avermelhada para branca, com a extremidade bifurcada; ovário ainda incluso no ciátio; 3 – Estiletes separados e reflexos apresentam coloração branca com brilho intenso; porção apical do ovário exposta; e 4 – Os estigmas apresentam coloração branca com brilho intenso, ovário totalmente exposto e emissão das primeiras flores masculinas.

Observou-se que, no estágio 1, formou-se menos da metade do número total de sementes produzidas em qualquer dos demais estádios. Portanto,

flores polinizadas no estágio 2 ou após garantem maior número de sementes por cruzamento e, além disso, podem ser emasculadas com maior facilidade. Contudo, é na transição entre os estádios 3 e 4, quando a flor feminina já está visível, os estigmas apresentam brilho intenso e as anteras estão próximas de serem emitidas, que se realiza a emasculação com maior facilidade e eficiência, devido ao tamanho mais adequado do ciátio e à facilidade de eliminação total das anteras.

No segundo dia após a polinização já é possível distinguir o pegamento dos frutos. Posteriormente, ocorre alongamento do pedicelo, que posiciona o fruto de forma pendente ao lado oposto ao do nectário. Caso a polinização não seja bem-sucedida, pode-se polinizar a flor novamente, uma vez que os ciátios permanecem viáveis por 10 a 15 dias, após o que são abortados.

A liberação de pólen pelas flores masculinas é maior com o aumento da temperatura, ocorrendo um pico sempre após o meio-dia, ao final da tarde.

O saco plástico usado para proteção dos cruzamentos também pode servir para recolher as sementes, evitando-se a necessidade de várias colheitas, já que a maturação dos ciátios é muito desuniforme. Deve-se ter cuidado caso haja cruzamentos distintos na mesma inflorescência, para não ocorrer misturas das sementes.

#### **4. CONCLUSÃO**

– As polinizações dos ciátios de leiteiro realizadas a partir do estágio 2, momento em que os estiletes estão separados e pouco reflexos sobre o ciátio, alterando a coloração avermelhada para branca, com a extremidade bifurcada, ovário ainda incluso no ciátio, não afetam o sucesso dos cruzamentos e nem o número de sementes formadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1984. v.2, 377p.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.
- INGROUILLE, M. **Diversity and evolution of land plants**. London: Chapman & Hall, 1992. 340p.
- KISSMANN, K.G. & GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. v.2, 798p.
- MAXWELL, B.D. & MORTIMER, A.M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S.B. & HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.1-25.

## HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE LEITEIRO (*Euphorbia heterophylla* L.) AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS

### RESUMO

Os herbicidas inibidores da ALS são os principais produtos empregados no controle do leiteiro em lavouras de soja. Contudo, já foram identificados biótipos desta planta daninha resistentes a esses herbicidas. O objetivo deste trabalho foi estudar herança, número de genes que conferem resistência e grau de resistência dos biótipos homozigotos e heterozigotos resistentes. Foram realizados cruzamentos recíprocos entre os genitores sensíveis e resistentes para obtenção de sementes  $F_1$ , e, posteriormente, realizaram-se os retrocruzamentos com os genitores resistentes e sensíveis. Plantas  $F_1$  foram autofecundadas artificialmente para obtenção da geração  $F_2$ . As plantas  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_r$  e  $RC_s$  e dos genitores foram tratadas com o herbicida imazethapyr ( $150 \text{ g ha}^{-1}$ ). Para avaliar o grau de resistência, plantas  $F_1$  e dos genitores resistentes e sensíveis foram tratadas com doses crescentes de imazethapyr (0, 100, 200, 400, 800 e  $1.600 \text{ g ha}^{-1}$ ). As plantas  $F_1$  mostraram-se totalmente resistentes ao herbicida, demonstrando que a resistência é nuclear e dominante. As plantas  $F_2$  apresentaram alta probabilidade para segregação 3:1, indicando que a resistência é codificada por um gene dominante. A aplicação de doses crescentes de imazethapyr sobre as plantas  $F_1$  indicou que os biótipos homozigotos resistentes e os heterozigotos apresentam o mesmo grau de resistência a doses de até  $1.600 \text{ g ha}^{-1}$  desse herbicida. A resistência é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa.

**Termos de indexação:** hibridação, dominância, acetolactato sintase e genética.

## INHERITANCE OF ALS INHIBITORS RESISTANCE IN *Euphorbia heterophylla* L. BIOTYPES

### ABSTRACT

The ALS inhibitor herbicides are the main products employed for control of *Euphorbia heterophylla* L. in soybean fields. However, it has been already identified resistant biotypes to this herbicides. The objective of this work was to study the inheritance, number of genes and the degree of the homozygous resistant biotypes. Reciprocal crossings were carried out between susceptible and resistant parents for obtaining of the F<sub>1</sub> seeds. Individuals from F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RCr and RCs and parents were sprayed with imazethapyr (150 g ha<sup>-1</sup>). Aiming to evaluate the resistance degree, F<sub>1</sub> plants and the resistant and susceptible parents were sprayed with crescent rates of imazethapyr (0, 100, 200, 400, 800 and 1,600 g ha<sup>-1</sup>). The F<sub>1</sub> plants were totally resistant to the herbicide, demonstrating that the resistance is nuclear and dominant. The F<sub>2</sub> presented high probability for 3:1 segregation, indicating that the resistance is coded by a dominant gene. The experiment with the F<sub>1</sub> plants sprayed with crescent rates of imazethapyr, demonstrated that the dominance is complete.

**Index terms:** Hybridization, dominace, inheritance, acetolatate synthase.

## 1. INTRODUÇÃO

O leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) é uma planta daninha herbácea, ereta, com 40-60 cm de altura, ciclo de 2-3 meses e se reproduz por sementes. É uma espécie com características variáveis, especialmente as folhas, que exibem grande variabilidade morfológica dentro de uma população; é uma espécie nativa das regiões tropicais e subtropicais das américas e uma infestante com alta capacidade competitiva, com crescimento e multiplicação rápidos (Kissmann & Groth, 1992).

O uso repetido de herbicidas para controle de plantas daninhas tem exercido alta pressão de seleção, provocando mudanças na flora de algumas regiões. Em geral, espécies e, ou, genótipos de uma espécie que melhor se adaptam a determinada prática são selecionados e se multiplicam rapidamente (Holt & LeBaron, 1990).

Os herbicidas pertencentes aos grupos químicos imidazolinonas e sulfoniluréias agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS), que atua na rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Hess, 1994). Esses herbicidas são largamente utilizados graças à sua baixa toxicidade a animais, alta seletividade às culturas e alta eficiência mesmo em doses baixas. Aproximadamente cinco anos após o início do uso desses herbicidas, surgiu a primeira espécie resistente (Powles & Holtum, 1994). Evidências indicaram que o aparecimento de resistência a um herbicida em uma população de plantas é devido à seleção de um genótipo resistente pré-existente, que, em razão da pressão de seleção, exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida, encontra condições para multiplicação (Betts et al., 1992).

Existem seis fatores relacionados à população de plantas, que se interagem e determinam a probabilidade e o tempo de evolução da resistência, sendo eles: número de alelos envolvidos na expressão da resistência; freqüência do(s) alelo(s) da resistência na população inicialmente sensível; o modo de herança do(s) alelo(s) da resistência (materna ou paterna); as características reprodutivas da espécie; a pressão de seleção; e a taxa de cruzamentos entre biótipos resistentes e sensíveis (Mortimer, 1998).

Quanto maior o número de genes envolvidos na resistência menor será a probabilidade de surgirem biótipos resistentes em uma população.

A frequência de alelo de resistência nas populações nativas geralmente está entre  $10^{-16}$  e  $10^{-6}$  (Mortimer, 1998), e, quanto maior a frequência do alelo, maior será a probabilidade de seleção de um biótipo resistente.

O tipo de herança é um aspecto importante no estabelecimento da resistência em uma população de plantas. Existem dois tipos de herança, a citoplasmática (materna) e a nuclear. Herança citoplasmática é aquela cujos caracteres hereditários são transmitidos via citoplasma; assim, somente a planta-mãe transmitirá a resistência para os descendentes; um exemplo são as plantas resistentes às triazinas. No entanto, se a herança for nuclear, tanto o pai quanto a mãe podem transmiti-la.

O processo da evolução da resistência a herbicidas, resumidamente, passa por três estádios: eliminação dos biótipos altamente sensíveis, restando apenas os mais tolerantes e resistentes; eliminação de todos os biótipos, exceto os resistentes – seleção destes dentro de uma população com alta tolerância; e intercruzamento entre os biótipos sobreviventes, gerando novos indivíduos com maior grau de resistência – que serão selecionados futuramente –, segregação e recombinação de genes (Mortimer, 1998).

Biótipos resistentes podem ocorrer em uma população de plantas daninhas como resultado de mutações que provocam alterações no local de ação do herbicida. Pequena alteração no polipeptídeo pode resultar em grande efeito sobre a afinidade com a molécula herbicida (Betts et al., 1992). A resistência de *Arabidopsis thaliana* às imidazolinonas é devida à alteração de um aminoácido da enzima ALS (Sathasivan et al., 1991). A resistência a imidazolinonas e sulfoniluréias é conferida por um gene dominante nuclear (Mazur & Falco, 1989; Powles & Holtum, 1994).

O uso repetido de herbicidas inibidores da ALS em lavouras de soja nos Estados do Rio Grande do Sul, do Paraná e de Mato Grosso do Sul levou à seleção de biótipos de *Bidens pilosa* L. resistentes a esses herbicidas (Ponchio, 1997). Biótipos de *E. heterophylla* L. resistentes a imidazolinonas vêm sendo observados em lavouras de soja no Estado do Rio Grande do Sul,

e acredita-se que o uso repetido de herbicidas desse grupo seja a causa desse fenômeno.

O conhecimento dos mecanismos e fatores que favorecem o aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes é fundamental para que técnicas de manejo sejam utilizadas para evitar ou retardar o seu aparecimento (Christoffoleti et al., 1994). O objetivo deste trabalho foi estudar o tipo de herança, o número de genes que conferem a resistência e o grau de resistência dos biótipos de *E. heterophylla* L. homozigotos e heterozigotos resistentes aos inibidores da ALS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, em 1999.

Para obtenção dos genitores homozigotos resistentes e homozigotos sensíveis, foram realizadas autopolinizações em 72 plantas de leiteiro resistentes e em seis sensíveis. As sementes, produzidas em cada planta autopolinizada, foram colhidas e armazenadas separadamente e mantidas em geladeira a 4-5 °C, durante cinco dias, para quebra da dormência. Para testar a homozigose, foram semeadas, de cada planta autopolinizada, 20 sementes em uma bandeja contendo 10 kg de solo. Quando as progênies atingiram estágio de 3-4 folhas, aplicou-se o herbicida imazethapyr, na dose de 200 g ha<sup>-1</sup>. Todos os genitores em que ocorreu morte de pelo menos uma planta, dentre as 20 testadas, foram descartados, sendo os demais considerados homozigotos resistentes ao herbicida. No entanto, consideraram-se homozigotos sensíveis aqueles genitores em que todas as 20 plantas testadas mostraram-se sensíveis ao tratamento herbicida. Foram selecionados 69 genitores homozigotos resistentes e seis homozigotos sensíveis ao imazethapyr.

Para realizar os cruzamentos, selecionaram-se um genitor homozigoto resistente e um homozigoto sensível. Sementes de cada genitor foram semeadas em vasos contendo 3 kg de solo. Após a emergência das plantas, foi procedido

o desbaste, deixando-se uma planta por vaso. A adubação química foi realizada na instalação do experimento, obedecendo à análise química do solo, tendo como base a cultura da soja.

Foram realizados cruzamentos recíprocos entre os genitores sensíveis e resistentes para obtenção de sementes  $F_1$ . Posteriormente, foram realizados retrocruzamentos entre plantas  $F_1$  e os respectivos genitores masculinos e femininos resistentes ( $RC_r$ ) e sensíveis ( $RC_s$ ). Sementes  $F_1$  foram semeadas em vasos, e as plantas originadas destas sementes foram autofecundadas para obtenção da  $F_2$ . As sementes  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_r$  e  $RC_s$  e dos genitores foram semeadas em bandejas com capacidade para 10 kg de solo. Após a aplicação do herbicida imazethapyr ( $150 \text{ g ha}^{-1}$ ), avaliou-se a sua reação ao herbicida. As frequências das classes obtidas foram testadas pelo teste do qui-quadrado.

Foram semeadas, em bandejas contendo 10 kg de solo, as sementes  $F_1$  e dos genitores resistentes e sensíveis. As plantas originadas dessas sementes foram tratadas com doses crescentes de imazethapyr (0, 100, 200, 400, 800 e  $1.600 \text{ g ha}^{-1}$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de plantas, número de plantas resistentes e sensíveis, relações observadas e esperadas, bem como os valores do teste  $\chi^2$  e as respectivas probabilidades, estão contidos na Tabela 1. Na Figura 1, representa-se um retrocruzamento sensível ( $RC_s$ ) com segregação resistente sensível 1:1.

Os genitores resistente (R) e sensível (S) confirmaram, respectivamente, sua resistência e sensibilidade ao herbicida.

No primeiro cruzamento sensível x resistente (S x R), a  $F_1$  apresentou-se totalmente resistente, demonstrando ser dominante à resistência. A população  $F_2$  apresentou segregação resistente/sensível 3,1:1, com o teste qui-quadrado fornecendo probabilidade de 82% desta ser 3:1. O retrocruzamento sensível ( $RC_s$ ) apresentou segregação resistente/sensível 0,9:1, com a probabilidade de 90% de ser 1:1 (Figura 1). Já o retrocruzamento resistente ( $RC_r$ ) apresentou plantas totalmente resistentes, evidenciando, também, o caráter dominante da resistência. Todos esses resultados são concordantes entre si.

Tabela 1 – Avaliação da segregação de cruzamentos, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre genótipos de *Euphorbia heterophylla* L. sensíveis (S) e resistentes (R) aos herbicidas inibidores da ALS. Viçosa, 1999

Cruzamento	Número de Plantas	Resistentes	Sensíveis	Relação		$\chi^2$	Probabilidade
				Esperada	Observada		
Sensíveis	150	0	150	-	-	-	-
Resistentes	137	137	0	-	-	-	-
<b>S x R:</b>							
F <sub>1</sub>	73	73	0	1:0	1:0	0,000	1,00
F <sub>2</sub>	170	129	41	3:1	3,1:1	0,070	0,82
RCs	61	30	31	1:1	0,9:1	0,016	0,90
RCr	61	61	0	1:0	1:0	0,000	1,00
<b>R x S:</b>							
F <sub>1</sub>	64	64	0	1:0	1:0	0,000	1,0
F <sub>2</sub>	203	154	49	3:1	3,1:1	0,080	0,79
RCs	82	43	39	1:1	1,1:1	0,190	0,70
RCr	66	66	0	1:0	1:0	0,000	1,00

O valor de  $\chi^2$  fornece a probabilidade de as diferenças entre as relações esperada e observada serem devidas ao acaso.



Figura 1 – Retrocruzamento sensível (RCs) após o tratamento com o herbicida imazethapyr ( $150 \text{ g ha}^{-1}$ ), com segregação resistente/sensível 1:1. Plantas resistentes apresentam maior altura e as sensíveis, menor. Viçosa, 1999.

No cruzamento recíproco, resistente x sensível (R x S), a geração  $F_1$ , como no primeiro cruzamento, mostrou-se totalmente resistente, indicando que a resistência também é transmitida hereditariamente pela planta-mãe e, novamente, que a resistência é uma característica dominante. A população  $F_2$  apresentou segregação resistente/sensível 3,1:1, com probabilidade de 79% de ser 3:1. O RCs apresentou segregação 1,1:1 com probabilidade de 70% de ser 1:1. O RCr apresentou-se, novamente, totalmente resistente.

A população  $F_1$ , em ambos os cruzamentos, mostrou-se totalmente resistente ao herbicida, demonstrando que a resistência é dominante e nuclear. Esses resultados são confirmados pelos retrocruzamentos analisados. As populações  $F_2$  apresentaram alta probabilidade para o padrão de segregação 3:1, indicando que a resistência é codificada por um gene dominante. Esses resultados estão de acordo com Mazur & Falco (1989), Mallory-Smith et al. (1990) e Powles & Holtum (1994).

Esses resultados evidenciam que a resistência apresentada pelos biótipos de leiteiro é codificada por um gene dominante nuclear. As características com herança do tipo nuclear têm disseminação rápida na população, via pólen, em espécies de fecundação cruzada. Contudo, a taxa de alogamia em leiteiro não é conhecida, portanto não é possível fazer previsões da disseminação deste gene em uma área.

A avaliação das plantas  $F_1$ , com doses crescentes de imazethapyr, evidenciou que as plantas homozigotas resistentes e as heterozigotas apresentam o mesmo grau de resistência a doses de até 1.600 g ha<sup>-1</sup> do herbicida e que as plantas sensíveis morrem com a dose de 100 g ha<sup>-1</sup>. O trabalho realizado por Seefeldt et al. (1998) indicou que biótipos heterozigotos de *Avena fatua* L., resistentes ao diclofop, apresentam grau intermediário de resistência ao herbicida. No trabalho desses autores, os biótipos homozigotos sensíveis e os heterozigotos foram controlados com as doses de 0,55 e 1,1 kg ha<sup>-1</sup> de diclofop, respectivamente. Já o biótipo homozigoto resistente não foi controlado com a dose de 5,5 kg ha<sup>-1</sup> do mesmo herbicida.

Assim, apesar de as plantas heterozigotas de leiteiro apresentarem o alelo recessivo (sensível), elas são igualmente resistentes às aquelas homozigotas resistentes, que apresentam os dois alelos dominantes (resistentes), indicando

ação gênica com dominância completa. Esse fato tem implicações práticas importantes, já que, em lavouras infestadas com essas plantas de leiteiro resistentes, o incremento da dose desse herbicida não proporcionará aumento no controle. Assim, a recomendação de aumento da dose de herbicida não é tecnicamente justificável.

#### 4. CONCLUSÕES

– A resistência aos herbicidas inibidores da ALS em *E. heterophylla* L. é controlada por um alelo nuclear dominante.

– Não há diferenças no grau de resistência entre os biótipos homozigotos resistentes e heterozigotos quando submetidos a aplicações de até 1.600 g ha<sup>-1</sup> de imazethapyr, indicando tratar-se de um caso de dominância completa.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTS, K.J.; EHLKE, N.J.; WYSE, D.L.; GRONWALD, J.W.; SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed science**, Champaign, v.40, n.2, p.184-189, 1992.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTÓRIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Brasília, v.12, n.1, p.13-20, 1994.
- HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: HERBICIDE ACTION COURSE, 1994. **Summary of lectures**. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.
- HOLT, J.S. & LeBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.141-149, 1990.
- KISMANN, K.G. & GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 1992. 798p.
- MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; DIAL, M.J.; ZEMETRA, R.S. Inheritance of sulfonyleurea herbicide resistance in *Lactuca* spp. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.4, p.787-790, 1990.

- MAZUR, B.J. & FALCO, S.C. The development of herbicide resistant crops. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 441-470, 1989.
- MORTIMER, A.M. **Review of graminicide resistance**. 1998. Web: [Http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm](http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm), 32 pag.
- PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* L. a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
- POWLES, S.B. & HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. [S.L.], CRC Press Inc., 1994. 353p.
- SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G.W.; MURAI, N. Molecular basis of imidazolinone herbicide resistance in *Arabidopsis thaliana* var columbia. **Plant Physiology**, v.97, n. 1, p.1044-1050, 1991.
- SEEFELDT, S.S.; HOFFMAN, D.L.; GEALY, D.R.; FUERST, E.P. Inheritance of diclofop resistance in wild oat (*Avena fatua* L.) biotypes from the Willamette Valley of Oregon. **Weed Science**, Champaign, v.46, n.2, p.170-175, 1998.

## 2. RESUMO E CONCLUSÕES

A evolução da resistência de plantas a herbicidas é dependente da pressão de seleção, da variabilidade genética da espécie daninha, do número de genes envolvidos, do padrão de herança, do fluxo gênico e da dispersão de propágulos. O conhecimento desses pontos é importante para embasar previsões de proporções futuras entre plantas resistentes, tolerantes e sensíveis em áreas afetadas, bem como para eleger métodos de manejo e controle. Desse modo, foram realizados na Universidade Federal de Viçosa, de março de 1997 a julho de 1999, quatro experimentos com biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS, com os objetivos de identificar biótipos resistentes e caracterizar essa resistência.

No primeiro experimento foram realizados estudos com biótipos de *Euphorbia heterophylla* L., com os objetivos de identificar e estudar os mecanismos envolvidos na resistência. O segundo experimento objetivou investigar a resposta dos biótipos resistentes a herbicidas com diferentes mecanismos de ação. No terceiro experimento, objetivou-se descrever uma técnica de cruzamento controlado em *Euphorbia heterophylla* L., para viabilizar futuros estudos genéticos com essa espécie. No quarto experimento, estudaram-se a herança, o número de genes que conferem resistência e o grau de resistência dos biótipos homozigotos e heterozigotos resistentes.

Os resultados permitiram concluir que:

- A insensibilidade da enzima ALS aos herbicidas que a inibem é o principal mecanismo responsável pela resistência das plantas de *Euphorbia heterophylla* L. a tais produtos.

- Os biótipos resistentes são controlados com eficiência com o uso de herbicidas com mecanismos de ação distintos dos inibidores da ALS.

- As polinizações e emascações realizadas no estágio 1 produzem grande número de ciátios com uma ou duas sementes e raramente com três. Já aquelas realizadas no estágio 2, ou acima deste, garantiram o sucesso dos cruzamentos com boa produção de sementes.

- A resistência é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa.

## APÉNDICE

## APÊNDICE A

Tabela 1A – Resumo da análise de variância dos dados obtidos no experimento “identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS/AHAS)”, referentes à produção de matéria seca em função da dose de imazapyr e imazethapyr do biótipo sensível e do resistente

Fontes de Variação	GL	Sensível	Resistente
Herbicidas	1	5.002,0833**	7.140,2500**
Doses	7	248.855,0000**	20.448,5357**
Herbicidas x Doses	7	1.161,0357**	447,6785**
Resíduo	32	379,8541	86,8333
CV (%)	47	5,3	8,1

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2A – Resumo da análise de variância dos dados obtidos no experimento “identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS/AHAS)”, referentes à resposta do biótipo sensível e do resistente a herbicidas com diferentes mecanismos de ação aos 7 e 14 dias após os tratamentos (DAT)

Fontes de Variação	GL	Toxicidade aos 7 DAT	Toxicidade aos 14 DAT
Biótipos	1	15.580,9141**	15.898,8271**
Herbicidas	14	5.855,5569**	5.725,4803**
Biótipos x Herbicidas	14	2.702,3986**	2.872,4323**
Resíduo	60	3,5223	0,5223
CV (%)	89	2,3	0,9

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 3A – Resumo da análise de variância dos dados obtidos no experimento “identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS/AHAS)”, referentes à atividade relativa da enzima acetolactato sintase em função da dose de imazapyr e imazethapyr do biótipo sensível e do resistente

Fontes de Variação	GL	Sensível	GL	Resistente Imazethapyr	GL	Resistente Imazapyr
Herbicidas	1	2.462,5382**	--	-----	--	-----
Doses	6	5.318,3608**	4	471,2697**	5	469,7591**
Herbicidas x Doses	6	99,9665**	--	-----	--	-----
Resíduo	28	2,4285	10	1,0062	12	2,6667
CV (%)	41	3,3	14	1,2	17	2,0

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4A – Resumo da análise de variância dos dados obtidos no experimento “identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS/AHAS)”, referentes à atividade da enzima acetolactato sintase do biótipo sensível e do resistente em função das diferentes concentrações de piruvato

Fontes de Variação	GL	Sensível	GL	Resistente
Concentrações	9	0,0224740**	7	0,0081822**
Resíduo	20	0,0000100	16	0,0000052
CV (%)	29	1,6	23	2,0

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.