

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Euphorbia heterophylla* (L.) AOS HERBICIDAS  
INIBIDORES DAS ENZIMAS ACETOLACTATO SINTASE (ALS) E  
PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE (PROTOX)

Ana Carolina Roso  
Engenheira Agrônoma/UFRGS  
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Ênfase Herbologia

Porto Alegre, Brasil  
Julho de 2013

ANA CAROLINA ROSO  
Engenheira Agrônoma - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

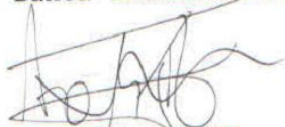
## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

## DOCTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 30.07.2013  
Pela Banca Examinadora

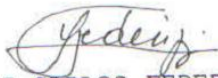


ALDO MEROTTO JUNIOR  
Responsável - PPG Fitotecnia  
RIBAS ANTONIO VIDAL  
Orientador - PPG Fitotecnia

Homologado em: 30 SET 2013  
Por



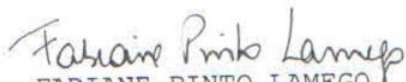
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia



LUIZ CARLOS FEDERIZZI  
PPG Fitotecnia



FERNANDA BERED  
PPG Genética e Biologia  
Molecular/UFRGS



FABIANE PINTO LAMEGO  
UFPel



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

DEDICO

*A minha família e especialmente  
ao meu marido João Vicente Roso  
pelo apoio incondicional.*

*“Há um tempo em que é preciso abandonar  
as roupas usadas, que já tem a forma do  
nosso corpo, e esquecer os nossos  
caminhos, que nos levam sempre aos  
mesmos lugares. É o tempo da travessia:  
e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado,  
para sempre, à margem de nós mesmos.*

*Fernando Pessoa“*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ribas Vidal, pela dedicação atribuída durante minha orientação no curso de doutorado, pelo estímulo ao crescimento e inovação, pelo aprendizado e conhecimento científico que me foi passado, estes sem valia;

À Professora Nilda Roma Burgos pela orientação, pelos preciosos ensinamentos, pelo exemplo de vida, pelo carinho e acolhimento durante todo o período do doutorado sanduíche nos EUA, meu eterno agradecimento e admiração;

Aos Professores Aldo Merotto, Luis Carlos Federizi e Fernanda Bered, membros da comissão de orientação, pelas reuniões, conselhos e orientação;

Em especial, ao meu marido João Vicente de Moraes Roso, meu companheiro de todas as horas, pela colaboração em todas as fases deste curso inclusive durante o período nos EUA, pelas noites mal dormidas, pelo ombro amigo, por todas às vezes em que precisei e estive do meu lado, por sua amizade e pelo amor incondicional, enfim por todo amor, compreensão e paciência que me foi dedicado;

À minha amada mãe Neiva Roso e ao querido Sérgio Lovato, pelas inúmeras acolhidas, pelos conselhos e por serem meu porto seguro nos momentos mais difíceis;

Ao meu amado pai Sérgio Roso pelas sábias palavras que me motivaram e me mantiveram mais confiante e forte durante fases mais complicadas;

À minha querida irmã Patrícia Roso por acreditar sempre no meu potencial, pela alegria e por ser o motivo de orgulho para a nossa família;

Aos queridos tios Celso e Mafalda Roso pelo carinho de todas as horas, pela acolhida, por serem grandes e amados pais;

À todos os professores do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial a Paulo Regis da Silva, pelos conhecimentos passados, conselhos, pelo convívio e pelo exemplo de pessoa;

Aos professores de outros departamentos em especial, Maria Teresa Schifino-Wittmann, pela ajuda e pelas contribuições no aprimoramento dos meus conhecimentos;

Aos funcionários Maria Alice Weber, Marisa Carvalho Bello, Fábio Martins Berndt, por todo apoio tanto em questões burocráticas quanto em questões pessoais, pela amizade, pelo aporte técnico;

Às minhas queridas e fiéis escudeiras Graciela Castilhos, Fernanda Mello e Daniela Barbosa pela amizade, por sempre estarem presentes, por toda a alegria, por todos os momentos de desabafo enfim por fazer o doutorado ficar mais fácil;

Aos demais amigos Divanilde Guerra, Thanise Nogueira Fuller, Carolina Tessele, Catarine Markus, Danielle Almeida, Everton Danilo Bortoly, Kelly Pelizzaro, Adriana Figueiró e Thaís Raquel Hagemann pelas horas de estudo, trabalho no laboratório, confraternizações e conversas;

Aos amigos que passaram Ives Goulart, Augusto Kalsing, Anderson Nunes e a todos os demais colegas mestrandos e doutorandos do Departamento de Plantas de Lavoura pela oportunidade de conhecê-los e por toda a ajuda;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a CAPES pelo aporte financeiro durante este curso;

À Deus por ser o guia de meus passos nessa caminhada, por colocar pessoas tão especiais na minha vida, por todas as situações proporcionadas que vieram a colaborar com meu crescimento como pessoa, por me ajudar a tornar real um dos objetivos de minha vida.

# RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Euphorbia heterophylla* (L.) AOS HERBICIDAS INIBIDORES DAS ENZIMAS ACETOLACTATO SINTASE (ALS) E PROTOPORFIRINOGENO OXIDASE (PROTOX)<sup>1</sup>

Autora: Ana Carolina Roso

Orientador: Ribas Antonio Vidal

## RESUMO

*Euphorbia heterophylla* (L.) (amendoim-bravo ou leiteira) é uma planta daninha infestante de diversas culturas ao redor do mundo. No Brasil, destaca-se principalmente pelos danos causados na cultura da soja. O controle desta espécie tornou-se dificultoso devido principalmente a resistência aos herbicidas. Foram identificados biótipos com resistência múltipla aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. Este trabalho teve como objetivos: a) verificar a ocorrência de resistência cruzada aos cinco grupos químicos dos inibidores da ALS; b) determinar o tipo de herança, o número de genes e o nível de resistência em parentais e geração F1; c) determinar o nível de ploidia, descrever o cariótipo, analisar o comportamento meiótico e quantificar a viabilidade dos grãos de pólen; d) determinar a base molecular da resistência; e) determinar o padrão de germinação; e f) investigar a ocorrência de resistência tríplice. Os resultados mostraram que os biótipos resistentes apresentam resistência cruzada aos cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS, assim como, a resistência a estes herbicidas é governada por um gene nuclear com dominância completa. A análise citogenética constatou tetraploidia ( $2n=28$ ), meiose regular e elevada viabilidade de grãos de pólen. Na determinação da base molecular não foi identificado mutações no fragmento do gene *als* de *Euphorbia*. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados visando obter o fragmento completo do gene. Pela primeira vez se tem relatos de um pequeno fragmento do gene *als* identificado nesta espécie. O padrão de germinação variou de acordo com a idade das sementes e entre biótipos suscetível e resistente. Em relação a resistência tríplice, os biótipos resistentes evoluíram resistência ao herbicida glifosato. Porém, o mecanismo responsável por esta resistência não é devido a absorção e translocação reduzida do herbicida. Os resultados obtidos no presente evidenciam que o mecanismo de resistência deve-se a alterações no local de ação sugerindo a ocorrência de mutações no gene ALS. Porém, a ocorrência de outro mecanismo de resistência não pode ser descartada para explicar o alto nível de resistência encontrado, uma vez que, a espécie de estudo apresenta resistência tríplice.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (128p.) Julho, 2013.

# MULTIPLE HERBICIDE RESISTANCE OF *Euphorbia heterophylla* (L.) TO ALS AND PROTOX INHIBITORS

Author: Ana Carolina Roso  
Adviser: Ribas Antonio Vidal

## ABSTRACT

*Euphorbia heterophylla* (L.) (wild poinsettia) is a troublesome weed in many crops around the world. In Brazil, may result in severe economic losses in soybean crop field. The control of this weed became difficult mainly due to herbicide resistance. Were identified biotypes with multiple resistances to ALS and PROTOX herbicide inhibitors. This study aimed to: a) verify the occurrence of cross-resistance to the five chemical groups of ALS inhibitors, b) determine the type of inheritance, the number of genes and resistance level in parental and F1 offspring, c) determine the ploidy level, describe the karyotype, analyze the meiotic behavior and quantify the pollen viability, d) determine the molecular basis of resistance, e) determine the pattern of germination, and f) investigate the occurrence of triple resistance. The result showed that the resistant biotypes are cross-resistant to five chemical groups of ALS inhibitors, as well as, the resistance to these herbicides is governed by a single nuclear gene with complete dominance. Cytogenetic analysis showed tetraploidy ( $2n = 28$ ) as ploidy level, regular meiosis and high viability of pollen grains. In the molecular basis determination were not identified mutations in the fragment correspond to *als* gene of *Euphorbia*. However, further studies should be conducted to obtain the full gene. For the first time in the literature was reported a small fragment of *als* gene in this species. The standard germination varied with the age of the seed and between susceptible and resistant biotypes. The resistant biotypes have evolved resistance to glyphosate. However, the mechanism responsible for this resistance is not due to reduced absorption and translocation of the herbicide. The results obtained in this study suggest the altered target site as mechanism of resistance and also the occurrence of mutations in the ALS gene. However, the occurrence of another resistance mechanism cannot be excluded to explain the high level of resistance encountered, since the studied species is triple resistant to ALS, PROTOX and EPSPS.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (128p.) July, 2013.



## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1 A planta daninha <i>Euphorbia heterophylla</i> (L.).....	5
2.1.1 Nomenclatura.....	5
2.1.2 Taxonomia.....	6
2.1.3 Distribuição e centro de origem.....	6
2.1.4 Características botânicas e reprodutivas.....	6
2.1.5 Dormência.....	8
2.1.6 Culturas infestadas.....	9
2.2 A cultura da soja.....	9
2.2.1 Histórico.....	10
2.2.2 Área e produção.....	10
2.2.3 Uso de defensivos agrícolas.....	11
2.2.4 Danos na produção devido a competição com plantas daninhas.....	11
2.2.5 Danos na produção devido a competição com <i>E. heterophylla</i> .....	12
2.3 Resistência aos herbicidas.....	13
2.3.1 Histórico e espécies resistentes.....	13
2.3.2 Tolerância <i>versus</i> resistência.....	14
2.3.3 Origem da resistência aos herbicidas.....	15
2.3.4 Mecanismos de resistência aos herbicidas.....	18
2.4 Resistência em <i>E. heterophylla</i> .....	19
2.4.1 Resistência cruzada.....	19
2.4.2 Resistência múltipla.....	21
2.4.3 <i>E. heterophylla</i> com resistência múltipla.....	22
2.5 Adaptabilidade ecológica – Germinação.....	24
2.6 Genética e biologia molecular na evolução da resistência.....	25
2.6.1 Número de genes envolvidos na resistência.....	25
2.6.2 Herança da resistência.....	27
2.6.3 Implicações do nível de ploidia na resistência.....	28
2.7 Determinação do nível de resistência por meio de curvas de dose-resposta.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 Material vegetal.....	33
3.2 Resistência cruzada aos inibidores da ALS (LE1).....	34
3.2.1 Curvas de dose-resposta aos inibidores da ALS.....	35
3.2.2 Ensaio enzimático ' <i>in vivo</i> '.....	38
3.2.3 Análise estatística.....	42

	Página
3.3 Herança do gene <i>als</i> (LE2).....	43
3.3.1 Geração dos parentais homozigotos.....	43
3.3.2 Cruzamentos genéticos para obtenção F1 e F2.....	44
3.3.3 Análise da segregação fenotípica.....	45
3.3.4 Determinação da herança e nível de resistência.....	46
3.4 Citogenética (LE3).....	47
3.4.1 Determinação número cromossômico e descrição cariótipo....	48
3.4.2 Análise do comportamento meiótico e viabilidade do pólen....	49
3.5 Estudos moleculares (LE4).....	50
3.5.1 Extração do material genômico.....	51
3.5.2 Desenho dos primers.....	51
3.6 Germinabilidade em <i>E. heterophylla</i> (LE5).....	57
3.7 Resistência tríplice em <i>E. heterophylla</i> (LE6).....	60
3.7.1 Curva de dose-resposta ao glifosato.....	60
3.7.2 Absorção e translocação de <sup>14</sup> C-glifosato.....	61
4 RESULTADOS .....	65
4.1 Resistência cruzada aos inibidores da ALS (LE1).....	65
4.1.1 Curvas de dose-resposta sobre o crescimento de plantas.....	65
4.1.2 Ensaio enzimáticos.....	72
4.2 Herança do gene <i>als</i> (LE2).....	74
4.3 Citogenética (LE3).....	78
4.3.1 Número cromossômico e cariótipo.....	78
4.3.2 Comportamento meiótico e viabilidade do pólen.....	79
4.4 Estudos moleculares (LE4).....	82
4.5 Germinabilidade em <i>E. heterophylla</i> (LE5).....	85
4.6 Resistência tríplice em <i>E. heterophylla</i> (LE6).....	91
5 DISCUSSÃO .....	96
5.1 Resistência cruzada aos inibidores da ALS (LE1).....	96
5.2 Herança do gene <i>als</i> (LE2).....	98
5.3 Citogenética (LE3).....	100
5.4 Estudos moleculares (LE4).....	103
5.5 Germinabilidade em <i>E. heterophylla</i> (LE5).....	104
5.6 Resistência tríplice em <i>E. heterophylla</i> (LE6).....	107
6 CONCLUSÕES .....	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112
8 VITA .....	128

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio de curva de dose-resposta em biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível (S) e resistentes (R) aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX. Porto Alegre-RS, 2012; Fayetteville-AR, 2013.....	37
2. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio enzimático em biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível (S) e resistentes (R) aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX. Fayetteville-AR, 2013.....	39
3. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> regulares e degenerados utilizados para isolar astrês regiões conservadas do gene <i>als</i> em <i>E. heterophylla</i> . Fayetteville-AR, 2012 e 2013.....	53
4. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> regulares desenhados a partir de espécies da família <i>euphorbiaceae</i> utilizados para isolar as três regiões conservadas do gene ALS em <i>E. heterophylla</i> . Fayetteville-AR, 2012 e 2013.....	54
5. Sequências nucleotídicas de um <i>primer</i> regular e dois degenerados utilizados para isolar as regiões CAD e F do gene <i>als</i> em <i>E. heterophylla</i> . Fayetteville-AR, 2013.....	56
6. Tratamentos utilizados para a análise de absorção e translocação do herbicida <sup>14</sup> C-glifosato em biótipos de <i>E. heterophylla</i> . Fayetteville-AR, 2013.....	62
7. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de controle (C <sub>50</sub> ) de biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013.....	66
8. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de redução da massa seca da parte aérea (GR <sub>50</sub> ) de biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013.....	69
9. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de redução da atividade enzimática (I <sub>50</sub> ) de biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX. Fayetteville-AR, 2012-13.....	72

	Página
10. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de controle (C <sub>50</sub> ) de biótipos de <i>E. heterophylla</i> parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) e de gerações F1 (♀S x ♂ALS e ♀S x ♂ALS/PPO) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	75
11. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter redução de 50% da massa seca de parte aérea (GR <sub>50</sub> ) de biótipos de <i>E. heterophylla</i> parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) e de gerações F1 (♀S x ♂ALS e ♀S x ♂ALS/PPO) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	76
12. Avaliação da segregação da resistência de cruzamentos entre biótipos de <i>E. heterophylla</i> parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) sob as gerações F1 (♀S x ♂ALS e ♀S x ♂ALS/PPO) aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	77
13. Número de células encontradas em biótipos de <i>E. heterophylla</i> resistente aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX (R ALS/PPO), resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS (R ALS) e no biótipo suscetível (S). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	81
14. Análise da viabilidade de grãos de pólen em biótipos de <i>E. heterophylla</i> resistente aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX (R ALS/PPO), resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS (R ALS) e no biótipo suscetível (S). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	81
15. Parâmetros da equação logística <sup>a</sup> utilizada na análise da curva de dose resposta em função da germinação acumulada de sementes com 12 meses de idade (V) e com 2 meses de idade (N) de biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> (L.) suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, sob diferentes temperaturas. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2011.....	86
16. Tempo médio de germinação em dias (MLIT), taxa de germinação (TG) e coeficiente de velocidade de germinação (CVG) de sementes com 2 meses de idade de biótipos de <i>E. heterophylla</i> S, R a ALS e R a ALS/PPO, sob diferentes temperaturas. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2011.....	90
17. Tempo médio de germinação em dias (MLIT), taxa de germinação (TG) e coeficiente de velocidade de germinação (CVG) de sementes com 12 meses de idade de biótipos de <i>E. heterophylla</i> S, R a ALS e R a ALS/PPO, sob diferentes temperaturas. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2011.....	91
18. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> usadas para determinar a dose de glifosato necessária para reduzir em 50 e 90% o controle (C <sub>50</sub> e C <sub>90</sub> ) de biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> (L.) suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores de ALS e PROTOX aos 28 dias após o tratamento (DAT). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	91

	Página
19. Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> usadas para determinar a dose de glifosato necessária para reduzir em 50 e 90% a massa seca da parte aérea (GR <sub>50</sub> e GR <sub>90</sub> ) de biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> (L.) suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores de ALS e PROTOX aos 28 dias após o tratamento (DAT). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	92

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Mesorregiões do estado do Paraná destacando a região sudoeste como o local de origem dos biótipos de <i>E. heterophylla</i> resistentes aos inibidores da enzima ALS, com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX e a origem do biótipo suscetível. A seta indica a localização dos municípios de Renascença, Vitorino e Pato Branco de onde o material vegetal foi coletado. Porto Alegre-RS, 2013.....	34
2. Rota de síntese simplificada dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A inibição de KARI pelo CPCA leva ao acúmulo de acetolactato que sofre descarboxilação e se transforma em acetoína. A acetoína reage com creatina e naphtol formando uma coloração rosada indicando a atividade enzimática da ALS. KARI: cetoácido reductoisomerase; CPCA: ácido ciclopropano dicarboxílico; ALS: acetolactato sintase. Porto Alegre-RS, 2013.....	40
3. Resumo das etapas do protocolo de extração da enzima ALS <i>in vivo</i> por meio do método colorimétrico (adaptado de Gerwick <i>et al.</i> 1993 e Lamego <i>et al.</i> 2009b). Porto Alegre-RS, 2013.....	41
4. Geração dos parentais para os cruzamentos. A seleção de parentais homozigotos resistentes ocorreu quando 100% das plantas autofecundadas sobreviveram e os parentais homozigotos suscetíveis foram obtidos quando houve 100% de morte das plantas. Porto Alegre-RS, 2010.....	44
5. Esquema mostrando o procedimento de polinização manual utilizado nos cruzamentos para a obtenção da geração F1. Porto Alegre-RS, 2013. Porto Alegre-RS, 2011.....	45
6. Esquema dos cruzamentos realizados para a obtenção das gerações F1 e F2. Porto Alegre-RS, 2011.....	45
7. Germinação de <i>E. heterophylla</i> em placas de petri com papel filtro utilizadas na determinação do número cromossômico somático e na descrição do cariótipo. Porto Alegre-RS, 2010.....	48
8. Inflorescência de <i>E. heterophylla</i> usada na determinação do comportamento meiótico e na análise da viabilidade de grãos de pólen. A) Vista com lupa anterior ao processo de fixação; B) Vista com lupa posterior ao processo de fixação. Porto Alegre-RS, 2011.....	49
9. Representação esquemática do gene <i>als</i> e <i>primers</i> utilizados para a sua amplificação. Os <i>primers</i> estão descritos na Tabela 3. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.....	53

	Página
10. Representação esquemática do gene <i>als</i> e <i>primers</i> utilizados na segunda etapa para a sua amplificação. Os <i>primers</i> estão descritos na Tabela 4. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.....	54
11. Representação esquemática do gene <i>als</i> e <i>primers</i> utilizados na terceira etapa para a sua amplificação. Os <i>primers</i> estão descritos na Tabela 4. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.....	56
12. Preparação das unidades experimentais para a análise da germinação de sementes de <i>E. heterophylla</i> resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. Porto Alegre-RS, 2010.....	58
13. Estádio de desenvolvimento da semente considerado na contagem de sementes germinadas. Porto Alegre-RS, 2010.....	58
14. Efeito dos herbicidas pertencentes aos cinco grupos químicos dos inibidores da ALS (A. imazethapyr; B. nicosulfuron; C.bispyribac; D. cloransulam; e E. flucarbazone) no controle (porcentagem injúria visual estimada) em biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias $\pm$ SE (n=4).....	68
15. Efeito dos herbicidas pertencentes aos cinco grupos químicos dos inibidores da ALS (A. imazethapyr; B. nicosulfuron; C.bispyribac; D. cloransulam; e E. flucarbazone) na massa seca da parte aérea (MSPA) em biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias $\pm$ SE (n=4).....	71
16. Efeito dos herbicidas pertencentes à quatro grupos químicos dos inibidores da ALS (A. imazethapyr; B. nicosulfuron; C.pyriothioac; e D. cloransulam) na atividade enzimática de biótipos de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente. Fayetteville-AR, 2012-13. Dados são as médias $\pm$ SE (n=4).....	73
17. Efeito de doses crescentes do herbicida imazethapyr sobre os parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) e sobre as gerações F1 ♀S x ♂ALS (A) e F1 ♀S x ♂ALS/PPO (B) em relação a variável 100-controle (%) (gráfico acima) e em relação a massa seca da parte aérea (gráfico abaixo). Porto Alegre-RS, 2012. Dados são as médias $\pm$ SE (n=4).....	75
18. Número cromossômico de células meristemáticas de ponta de raiz da espécie <i>E. heterophylla</i> . A) Biótipo com resistência múltipla aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX; B) Biótipo com resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS; C) Biótipo suscetível. Barra equivale a 10 $\mu$ m. Porto Alegre-RS, 2012.....	78
19. Cariótipo de <i>E. heterophylla</i> composto de 12 pares de cromossomos meta ou submetacêntricos, um par de cromossomos acrocêntricos (cabeça de seta) e um par de cromossomos satélites metacêntricos (seta). Barra equivale a 10 $\mu$ m. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	79
20. Células em metáfase I de biótipos de <i>E. heterophylla</i> resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. A) Seta indica um cromossomo univalente; B) Seta indica um cromossomo bivalente; C) Seta indica um cromossomo trivalente; D) Seta indica um cromossomo tetravalente. Barra equivale a 10 $\mu$ m. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	80

	Página
21. Fases da meiose identificadas no biótipo de <i>E. heterophylla</i> resistente aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. A) Célula em anáfase I; B) Célula em anáfase II; C) Célula em metáfase I; D) Célula em telófase I; E) Célula em telófase II; e F) Célula em diacinese. Barra equivale a 10 µm. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	80
22. Graus de coloração dos grãos de pólen. A) Bem corado (BC); B) Pouco corado (PC); C) Não corado (NC); D) Inviável. Barra equivale a 10 µm. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	82
23. Esquema mostrando a direção de maturação das anteras que ocorre do topo em direção a base da inflorescência. Cada inflorescência de <i>E. heterophylla</i> é formada por 4 estiletos ou filamentos contendo 6 anteras em cada filamento. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.....	82
24. Gel mostrando reação de PCR em que foram utilizados os primers correspondentes as etapas 1 e 2 para o isolamento do gene <i>als</i> . A primeira coluna indica o marcador de peso molecular de 1kb. As demais colunas são os primers utilizados com o respectivo tamanho de fragmento esperado. A ordem nas colunas dentro de cada primer é S, R ALS, R ALS/PPO e branco. Fayetteville-AR, 2012.....	83
25. Gel mostrando reação de PCR em que foram utilizados os primers da terceira etapa para o isolamento do gene <i>als</i> . A primeira coluna indica o marcador de peso molecular de 50 pb. As demais colunas são os biótipos S, R ALS, R ALS/PPO e branco sob diferentes temperaturas de anelamento. Fayetteville-AR, 2013.....	84
26. Alinhamento da sequência nucleotídica de <i>E. heterophylla</i> obtida com a utilização do <i>primer</i> ALS 3 com diferentes espécies. Fayetteville-AR, 2013. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	84
27. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 16°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.....	87
28. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 20°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.....	87
29. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 26°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.....	88
30. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de <i>E. heterophylla</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 32°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.....	89



	Página
31. Germinação acumulada aos 12 dias após a germinação (DAG) de sementes novas (2 meses) (A) e sementes velhas (12 meses) (B) de <i>Euphorbia heterophylla</i> (L.) suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, submetidas as temperaturas de 16, 20, 26 e 32°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.....	90
32. Efeito do herbicida glifosato no controle (A) e na massa seca da parte aérea (MSPA) (B) em biótipos de <i>E. heterophylla</i> S, R ALS e R ALS/PPO. Porto Alegre-RS, 2012. Dados são as médias $\pm$ o erro padrão SE (n = 4).....	93
33. Absorção expressa em porcentagem do total de herbicida <sup>14</sup> C-glifosato aplicado em biótipos de <i>E. heterophylla</i> S e R aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias $\pm$ o erro padrão SE (n = 4).....	94
34. Distribuição da porcentagem de <sup>14</sup> C-glifosato absorvido aplicado em diferentes partes da planta em biótipos de <i>E. heterophylla</i> S e R aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. A) Folha tratada; B). Folha não-tratada; C) Colmos; e D) Raízes. Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias $\pm$ o erro padrão SE (n = 4).....	95

## 1 INTRODUÇÃO

A presença de plantas daninhas nos ecossistemas agrícolas pode acarretar em perdas na ordem de 5 até 40% na produtividade das culturas (VIDAL *et al.*, 2010). O controle químico é o método de manejo de plantas daninhas mais empregado. Entretanto, o uso contínuo de herbicidas com o mesmo modo de ação, acarretou na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Atualmente, no mundo foram identificadas 217 espécies resistentes distribuídas em 61 países (HEAP, 2013). No Brasil das 31 espécies resistentes, oito apresentam resistência múltipla, entre elas *Euphorbia heterophylla* (L.).

A leiteira, *E. heterophylla* (EPHHL), é uma planta daninha distribuída mundialmente afetando diversas culturas. No Brasil causa danos severos principalmente na cultura da soja. Um dos principais fatores que dificultam o controle desta espécie é a resistência a mais de um modo de ação herbicida, a resistência múltipla.

O controle químico de plantas daninhas com resistência múltipla se torna dificultoso frente à inexistência de moléculas herbicidas alternativas eficientes e de baixo custo. Outro fator relevante é a questão do número de genes envolvidos. Em indivíduos com resistência múltipla, a herança da resistência é poligênica, ou seja, devido à ação de dois ou mais genes. Nesse caso, os estudos moleculares buscando a identificação do(s) mecanismo(s) de resistência, bem como todo o

conhecimento gerado em função da elucidação destes mecanismos, se tornam muito mais complicados.

Adicionalmente, a natureza poliploide das espécies também dificulta o estudo da resistência aos herbicidas. Isto ocorre porque, uma vez ocorrendo alterações no local de ação do herbicida, mutações no gene alvo, estas teriam a oportunidade de ocorrer em mais de um genoma da planta. Desta forma, a identificação deste mecanismo também é dificultada. Estima-se que grande parte das plantas daninhas sejam poliploides, incluindo *E. heterophylla*.

A evolução da resistência múltipla em biótipos de EPHHL sugere possivelmente a ocorrência de diferentes mecanismos de resistência devido ao histórico de uso dos herbicidas para o controle desta infestante e além disso a ocorrência de mecanismos já relatados em outras espécies. O controle de EPHHL durante sucessivos anos era exclusivamente realizado apenas com a utilização dos herbicidas inibidores da ALS e conseqüentemente surgiram biótipos resistentes a estes herbicidas. Como alternativa de controle a estes biótipos resistentes fez-se uso contínuo dos herbicidas inibidores de PROTOX resultando no quadro atual de biótipos com resistência múltipla.

Além disto, nessa espécie ocorreu a evolução da resistência a um terceiro modo de ação, os inibidores da EPSPS, sendo o herbicida glifosato o principal representante deste grupo. A resistência tríplice, neste caso, seria a resistência aos inibidores de ALS, PROTOX e EPSPS. A hipótese da resistência ao glifosato nestes biótipos fundamenta-se no predomínio de mecanismos de resistência que envolvem alterações na absorção e translocação deste herbicida, comumente encontrados nas plantas daninhas resistentes a este herbicida.

Estudos básicos elucidando os mecanismos de resistência são fundamentais devido ao conhecimento gerado, uma vez que a identificação do

mecanismo de resistência aos herbicidas em plantas daninhas permite avançar o conhecimento de um processo fisiológico vegetal até então desconhecido.

O ineditismo a que este trabalho se propõe consiste em elucidar o mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, até então não identificado, em *E. heterophylla* com resistência múltipla e ainda, poliplóide. Estudos deste tipo são eventualmente encontrados na literatura dado as dificuldades existentes para a execução e obtenção de resultados.

Portanto, dada a ausência da abordagem molecular e também genética da resistência múltipla aos herbicidas inibidores de ALS e de PROTOX em biótipos de leiteira, o presente trabalho objetiva estudar este tema e desta forma, fornecer subsídios para auxiliar no manejo desta importante planta daninha.

Este trabalho foi dividido em diferentes linhas de estudo (LE) de acordo com cada hipótese e objetivo específico.

As hipóteses deste trabalho foram:

- i. Os biótipo resistentes de *E. heterophylla* apresentam resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS, ou seja, são resistentes a mais de um grupo químico;
- ii. Um gene maior de grande efeito fenotípico com herança nuclear é o responsável pela resistência aos herbicidas inibidores da ALS;
- iii. A planta daninha *E. heterophylla* possui natureza poliploide;
- iv. O mecanismo de resistência nos biótipos resistentes de *E. heterophylla* deve-se a alterações no local de ação da enzima ALS;
- v. Sementes velhas (12 meses de idade) germinam menos do que sementes novas (2 meses), e que sob temperaturas mais elevadas há maior germinação do que em temperaturas mais baixas;

- vi. Os biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, também desenvolveram resistência ao herbicida glifosato.

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Verificar a ocorrência de resistência cruzada aos cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS;
- b) Determinar o tipo de herança, o número de genes que conferem a resistência e o nível de resistência em biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX;
- c) Determinar o nível de ploidia em biótipos suscetível e resistentes aos herbicidas, descrever o cariótipo, analisar o comportamento meiótico e quantificar a viabilidade dos grãos de pólen da espécie *E. heterophylla*;
- d) Determinar a base molecular da resistência nessa espécie.
- e) Comparar a adaptabilidade ecológica em relação a germinabilidade entre biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX;
- f) Investigar a ocorrência de resistência tríplice.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica realizada no presente trabalho visa relatar aspectos relacionados a resistência múltipla na espécie daninha *E. heterophylla*. Inicialmente serão relatados aspectos ecofisiológicos sobre a biologia da planta daninha *E. heterophylla*. Um tópico particular será abordado sobre a cultura da soja devido a importância desta cultura em função da interferência com a planta daninha em estudo.

Os itens seguintes apresentados nesta revisão irão discutir temas como: a resistência aos herbicidas de forma geral, a resistência aos herbicidas em *E. heterophylla*, a germinação, a genética e a biologia molecular na evolução da resistência e a determinação do nível de resistência aos herbicidas por meio de curvas de dose-resposta.

### 2.1 A planta daninha *Euphorbia heterophylla* L.

Neste item serão abordadas características da planta daninha como: nomenclatura; taxonomia; distribuição; centro de origem; características botânicas, reprodutivas e de dormência; e as principais culturas agrícolas prejudicadas em função da competição com *E. heterophylla*.

#### 2.1.1 Nomenclatura

*E. heterophylla* é uma planta de ciclo anual considerada uma das espécies de plantas daninhas mais nocivas das lavouras (LORENZI, 2006). Popularmente

é conhecida como amendoim-bravo ou leiteira. A nomenclatura popular deve-se ao fato desta espécie possuir látex leitoso em todas as partes da planta. Também pode ser identificada como EPHHL (atual código EPPO ou antigo código Bayer), cujas três letras iniciais descrevem o gênero e as duas letras finais a espécie (EPPO, 2013).

### **2.1.2 Taxonomia**

A espécie *E. heterophylla* de acordo com a classificação taxonômica pertence ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, subfamília Euphorbioideae e gênero Euphorbia (RADCLIFFE-SMITH, 2001). O gênero Euphorbia perfaz o segundo maior dentro das angiospermas (MABBERLEY, 2008) sendo composto por 2150 espécies (BRUYNS *et al.*, 2006). O elevado número de espécies dentro de um mesmo gênero caracteriza o potencial de algumas destas espécies se tornarem plantas daninhas devido ao potencial de propagação, competição e de adaptação em diferentes condições ambientais. Outro fator relevante na determinação de espécie como daninha é a sua distribuição ao redor do mundo.

### **2.1.3 Distribuição e centro de origem**

*E. heterophylla* apresenta centro de origem compreendido na região Brasil-Paraguai (CRONQUIST, 1981). Porém, distribui-se em mais de 40 países das Américas, África e Ásia sendo no Brasil amplamente dispersa nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (KISSMANN & GROTH, 1992). A dispersão da espécie fica fortemente relacionada ao modo de reprodução bem como outras características botânicas e anatômicas da planta.

### **2.1.4 Características botânicas e reprodutivas**

A leiteira é considerada altamente prolífera podendo produzir até 4.500 sementes por ano (FAO, 2013). A rápida multiplicação explica-se pelo fato de

apresentar ciclo anual curto, sendo possíveis duas a três gerações em uma única temporada (KISSMAN & GROTH, 1992). O tipo de reprodução pode ser tanto por autofecundação como por fecundação cruzada (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984; INGROUILLE, 1992). Essa espécie se desenvolve bem em quase todos os tipos de solo, preferindo, no entanto, os férteis e bem drenados. A via fotossintética do leiteiro é C4 (KISSMANN & GROTH, 1992).

Em relação a sua morfologia apresenta porte médio de 30 a 100 cm de altura com caules ocos simples ou com ramificações angulares (CRONQUIST, 1981). As folhas ocorrem tanto no caule quanto nos ramos e têm formas variáveis (como sugere o nome da espécie). As folhas inferiores são alternadas e as folhas superiores são opostas e muitas vezes têm uma base vermelha esbranquiçada ou brilhante (FAO, 2013). Esta coloração explica o nome comum em inglês '*wild poinsettia*' para esta planta.

As plantas podem começar a florescer cedo até 30 dias após a emergência. A polinização é realizada por insetos que são atraídos pelas grandes quantidades de néctar nas flores. No gênero *euphorbia* cada flor individualmente é uma estrutura bissexual chamada ciátio. Cada ciátio abriga de 30 a 40 androceus e apenas um gineceu.

Os androceus são formados por estames articulados no pedúnculo. O gineceu é constituído pelo ovário e por estiletos fendidos até a metade, apoiada em grosso pedúnculo que logo após a fecundação se alonga posicionando o fruto de forma pendente ao lado do involúcro (brácteas fusionadas). Conjuntos de ciátios formam a inflorescência que fica localizada na parte terminal do caule e dos ramos (KISSMANN & GROTH, 1992).

Apesar de ser considerada uma planta de reprodução mista, a estrutura botânica reprodutiva descrita sugere a predominância da autofecundação. Dessa



forma, os estudos de herança desta espécie necessitam de técnicas de polinização cruzada específicas (VARGAS *et al.*, 1999). Para o entendimento da genética desta planta é necessário o entendimento da botânica bem como de detalhes no desenvolvimento do botão floral, de forma a garantir a maior quantidade de frutos produzidos.

Os frutos são compostos de três lóbulos e quando maduros apresentam deiscência explosiva, dispersando as sementes 1 m ou mais a partir da planta-mãe (CRONQUIST, 1981; KISSMAN & GROTH, 1992). As sementes são formadas de 20 a 25 dias após a polinização, porém a confirmação da fecundação pode ser visualizada 24 horas após a polinização (observação pessoal). As sementes podem ser globosas, ovóides, cônicas, mais ou menos angulares, com 2,5 a 3 mm de comprimento por 2,5 mm de largura e possuem dois cotilédones e testa escura (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984; KISSMANN & GROTH, 1992).

A emergência das sementes durante o processo de germinação é maior quando estas estão de 0-8 cm de profundidade (40 a 47%) e cai para 22% a 10 cm, 12% a 12 cm e de zero a 14 centímetros (FAO, 2013). Esta capacidade de emergir em tais profundidades aumenta a capacidade competitiva e a dificuldade no controle de *E. heterophylla*.

A dormência também é uma das características de plantas daninhas que explicam a competitividade com as culturas.

#### **2.1.5 Dormência**

Em áreas tropicais com temperaturas alternadas entre 25 a 35°C as sementes recém-colhidas não são dormentes (FAO 2013), pois nestas temperaturas a germinação é estimulada (KISSMANN & GROTH, 1992). Entretanto, em regiões temperadas as sementes estão dormentes (FAO 2013).

Esta é uma adaptação evidente para ambientes mais frios pois se as sementes germinassem seriam mortas devido as temperaturas de inverno. A germinação de sementes durante um período prolongado no campo e as taxas de crescimento elevado, são fatores que tornam esta planta daninha extremamente competitiva com as culturas.

#### **2.1.6 Culturas infestadas**

*E. heterophylla* infesta diversas culturas, legumes, pastagens e terrenos baldios e é particularmente problemática em soja, ervilhas, milho e cana de açúcar (FAO, 2013). É planta daninha de ervilhas na Nigéria; mandioca em Gana; de citros, abacate e manga, na Flórida (EUA); de soja na Nigéria, Brasil e nos EUA; de cacau, chá e arroz de sequeiro em Sumatra, e de algodão em Israel (FAO, 2013). A diversidade de culturas afetadas, bem como a distribuição global, mostram a capacidade desta planta em crescer e competir em diversos ambientes e diferentes sistemas de cultivo.

No Brasil *E. heterophylla* infesta diversas culturas de interesse econômico como: soja, milho, arroz, banana (LORENZI, 2006), feijão (COBUCCI *et al.*, 1999) e amendoim (WILLARD & GRIFFIN, 1993). Porém a principal cultura afetada por esta planta daninha, cujos danos são relatados com frequência na literatura é a cultura da soja.

### **2.2 A cultura da soja**

Neste item serão apresentados informações sobre: histórico; área e produção; uso de defensivos agrícolas; e danos na produtividade devido a competição com plantas daninhas de forma geral e devido exclusivamente a competição com *E. heterophylla*.

### **2.2.1 Histórico**

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é destaque entre as principais oleaginosas produzidas no mundo (SILVA *et al.*, 2009). Pertencente a família botânica Fabaceae (leguminosas), é originária da costa leste da Ásia onde inicialmente eram cultivadas espécies selvagens, principalmente na China (EMBRAPA, 2013).

No oriente é cultivada a mais de cinco mil anos enquanto no ocidente a exploração da cultura iniciou apenas na segunda década do século vinte nos Estados Unidos (EUA). Inicialmente como forrageira e, posteriormente, como grão. Em meados dos anos 60, a área cultivada para a produção de grãos começou a crescer de forma exponencial, não apenas nos EUA, como também no Brasil e Argentina (EMBRAPA, 2013).

### **2.2.2 Área e produção**

EUA, Brasil e Argentina são responsáveis por mais de 80% da produção global. Mundialmente são produzidas cerca de 252 milhões de toneladas sendo os EUA responsáveis por 33%, Brasil 29% e Argentina 19% (SOYSTAT, 2013). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial da cultura da soja (FAOSTAT, 2013). Segundo levantamentos da safra 2012/13 a área plantada foi de 27 milhões de hectares e a previsão de produção supera 83 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Baseado nessas estatísticas o Brasil passa a ser o maior produtor mundial desse grão.

Nos últimos doze anos a produção de soja teve um acréscimo de 62% (FAOSTAT, 2013). Este aumento de produção deve-se a alguns fatores como: elevado teor de óleo nos grãos (20%), farelo amplamente utilizado na formulação de ração, elevada produção de proteína (40%), grãos ricos em qualidades nutricionais e funcionais para a alimentação humana, e recentemente pela possibilidade da utilização de seu óleo como biocombustível (MENEGATTI &

BARROS, 2007; RIZZARDI *et al.*, 2010). Estes fatores somados ao lançamento da soja transgênica, no ano de 1996, resistente ao herbicida glifosato, culminaram em aumento crescente da demanda pelo produto e na multiplicação das áreas cultivadas (OWEN, 2008).

### **2.2.3 Uso de defensivos agrícolas**

Para suprir a elevada demanda mundial por alimentos é necessária a utilização de ferramentas agrícolas que otimizem a produção como o uso de defensivos agrícolas. A demanda mundial de pesticidas é estimada em torno de U\$ 45 bilhões (McDOUGALL, 2008), sendo os herbicidas responsáveis por quase metade (46%) deste mercado (COBB & READE, 2010). No Brasil somente a cultura da soja consome aproximadamente 30% de todos os produtos agrícolas comercializados para proteção de plantas, estimado em mais de U\$ 2,1 bilhões, sendo a maior parte constituída pelos herbicidas (ANDEF, 2006). As culturas de forma geral são muito dependentes dos herbicidas devido a necessidade do controle de plantas daninhas.

### **2.2.4 Danos na produção devido a competição com plantas daninhas**

Plantas daninhas, mais do que insetos ou doenças, são as maiores causadoras de perdas potenciais de produção nas culturas (MEYER & CEDERBERG, 2010). Na cultura da soja o dano potencial estimado é 40% de perda de produção, entretanto essa estimativa pode ser reduzida a apenas cerca de 5-16%, graças ao uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas (RIZZARDI *et al.*, 2010). Porém, as perdas de produção de soja causadas pelas plantas daninhas, em condições de clima tropical e subtropical, são bastante variáveis conforme o tipo de controle (manejo de controle empregado) e conforme o tipo de soja (convencional ou transgênica).

Também foram relatadas perdas potenciais de 40% na média mundial, caso não fosse empregado manejo de infestantes (OERKE, 2004; VIDAL *et al.*, 2010). Com a utilização de estratégias de manejo, tende-se a minimizar estes prejuízos. Porém as medidas de controle nem sempre atingem a plenitude desejada. Desta forma, estima-se que ainda ocorram 5 a 16% de perda de grãos devido à presença de plantas daninhas, mesmo com a utilização de medidas de controle (OERKE, 2004).

### **2.2.5 Danos na produção devido a competição com *E. heterophylla***

Dentre as plantas daninhas mais nocivas na cultura da soja destaca-se *E. heterophylla*. No Brasil, reduções na produtividade na ordem de 50% foram relatadas quando a cultura foi mantida sob densidade de infestação de 32 plantas/m<sup>2</sup> durante todo o ciclo da cultura (BRIDGES *et al.*, 1992). Há ainda relatos de redução de 12% sob competição de 42 plantas/m<sup>2</sup> (KARAM *et al.*, 1993). Na convivência durante 45 dias, 12 e 52 plantas/m<sup>2</sup> de *E. heterophylla*, reduziram o rendimento em 6% e 16%, respectivamente, e convivendo durante 115 dias, reduziram o rendimento em 22% e 50%, respectivamente (CHEMALE & FLECK, 1982). Nos EUA, 8 plantas/m<sup>2</sup> durante todo o ciclo da cultura, resultaram em perdas de 33% na produtividade (FAO, 2013).

Os dados de competição *versus* perdas de produção são divergentes pois dependem de diferentes fatores como clima, solo, densidade de plantas daninhas e principalmente da metodologia utilizada para a obtenção destes resultados. Há ainda as perdas na cultura da soja relacionadas com perdas indiretas, como por exemplo, prejuízos na morfologia e desenvolvimento da cultura.

Reduções na estatura da planta, número de trifólios, matéria seca e acúmulo de macronutrientes foram relatados quando a soja foi mantida sob competição com mais de 15 plantas/m<sup>2</sup> de *E. heterophylla* (CARVALHO *et al.*,

2010). Menor absorção de água e nutrientes pelas plantas de soja devido à interferência imposta pela planta daninha justificam a redução de trifólios (ADELUSI *et al.*, 2006). Essa competição também resultou em redução no acúmulo de matéria seca em soja sob a presença de plantas de *E. Heterophylla* convivendo com a cultura (RIZZARDI *et al.*, 2004). A competição por nutrientes fica evidenciada quando plantas de soja sob competição com essa planta daninha resultaram em redução nos teores de macronutrientes (BIANCO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010). Além dos danos diretos de produtividade e indiretos no desenvolvimento da cultura, há um outro fator de extrema relevância responsável por dificultar o controle desta planta daninha, a resistência aos herbicidas.

### **2.3 Resistência aos herbicidas**

Os itens seguintes dessa revisão irão abordar temas como a resistência aos herbicidas (histórico e espécies resistentes, tolerância vs resistência, origem e mecanismos de resistência).

#### **2.3.1 Histórico e espécies resistentes**

O primeiro caso de planta daninha resistente no mundo foi documentado em 1952, quando foram identificados biótipos de *Daucus carota* resistentes ao herbicida 2,4-D, no Canadá (SWITZER, 1952). Posteriormente, foram identificados biótipos de *Commelina difusa*, também resistentes ao 2,4-D, nos Estados Unidos (HILTON, 1957; WHITEHEAD & SWITZER, 1967). No ano de 1970, também nos Estados Unidos foram constatados biótipos de *Senecio vulgaris* resistentes ao herbicida simazine, uma triazina pertencente ao grupo dos herbicidas inibidores do fotossistema II (RYAN, 1970). Desde então, ano a ano novos casos de resistência são registrados mundialmente (HEAP, 2013).

No Brasil o primeiro caso registrado de planta daninha resistente, ocorreu em 1992, com a identificação de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da ALS (GAZZIERO et al., 1998). No ano seguinte, foram identificados biótipos de *Bidens pilosa* (L.) resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS, no estado do Mato Grosso do Sul (PONCHIO, 1997; CHRISTOFFOLETI & FOLONI, 1999).

Atualmente foram identificados 400 biótipos e 217 espécies (129 dicotiledôneas e 88 monocotiledôneas) de plantas daninhas resistentes aos herbicidas (HEAP, 2013). Estas desenvolveram resistência aos 21 dos 25 modos de ação dos herbicidas e a 148 diferentes moléculas químicas conhecidas. Além disto, foram identificados plantas daninhas resistentes em 65 culturas distribuídas em 61 países (HEAP, 2013). Estes dados são oficialmente registrados em banco de dados com plantas daninhas resistentes aos herbicidas (HEAP, 2013). Entretanto, o número de plantas daninhas resistentes atinge valores bem mais elevados se for considerado os casos que não foram depositados on-line.

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um problema global e um dos maiores desafios da agricultura moderna. Quando uma nova espécie resistente é identificada perde-se um modo de ação de herbicida para o controle desta espécie. A escassez de alternativas para a rotação de herbicidas com diferentes modos de ação é um dos fatores relevantes no surgimento de novos biótipos resistentes. Dessa forma é necessário o conhecimento de todas as características que envolvem a resistência começando pela correta definição do termo e do não-confundimento com tolerância.

### **2.3.2 Tolerância versus resistência**

Na ciência das plantas daninhas há um confundimento em relação a definição dos termos tolerância e resistência de plantas daninhas aos herbicidas.

Por este motivo a *Weed Science Society of America* (WSSA) definiu ambos os termos (VENCILL *et al.*, 2012). Tolerância é a capacidade inata de algumas espécies em sobreviver e se reproduzir mesmo sofrendo injúrias, após o tratamento com o herbicida (VARGAS *et al.*, 2009). Exemplos clássicos de plantas tolerantes ao herbicida glifosato podem ser citados como *Richardia brasiliensis* (poaia) e *Ipomea* spp (corda de viola) (MONQUERO *et al.*, 2004). A tolerância implica em não haver nenhum fator de seleção ou manipulação genética, ou seja, a planta é naturalmente tolerante.

A resistência aos herbicidas é definida como a capacidade herdável de uma planta em sobreviver e se reproduzir após exposição a uma dose normalmente letal de herbicida para o tipo selvagem (VIDAL & MEROTTO, 2001; COBB & READE, 2010). Na planta a resistência pode estar ocorrendo por um processo de evolução independente envolvendo vários processos, via técnicas de engenharia genética ou por fluxo gênico com culturas resistentes aos herbicidas (VENCILL *et al.*, 2012).

### **2.3.3 Origem da resistência aos herbicidas**

Para uma espécie sensível, há plantas naturalmente tolerantes a determinados herbicida (s). Plantas resistentes aos herbicidas desenvolvem-se em função de processos específicos como evolução independente devido à pressão de seleção, manipulação gênica ou fluxo gênico.

A pressão de seleção ocorre pelo uso contínuo de um herbicida com um mesmo mecanismo de ação durante sucessivos ciclos de cultivo ocasionando em seleção de biótipos resistentes. Algumas plantas podem sobreviver a aplicação do herbicida, se reproduzem e cada geração é exposta ao mesmo herbicida. O resultado é o aumento do número de plantas resistentes até que estas dominem a população de plantas suscetíveis (VENCILL *et al.*, 2012).



A evolução independente da resistência caracteriza-se por ser um processo dinâmico. Os fatores que atuam influenciando esse processo podem ser fatores genéticos, biologia da planta daninha, características do herbicida e fatores operacionais (POWLES & YU, 2010). Dentre os fatores genéticos destacam-se a frequência, número, dominância e valor adaptativo dos genes de resistência; fatores da biologia da planta daninha: fecundação cruzada e/ou autofecundação, capacidade de produção de sementes, dormência, capacidade de dispersão de semente e pólen; fatores relacionados ao herbicida: estrutura química, local de ação, atividade residual; e dentre os fatores operacionais: doses de herbicidas utilizadas, frequência de aplicação e manejo da cultura (POWLES & YU, 2010).

A origem da resistência aos herbicidas também pode ocorrer por intermédio de técnicas de engenharia genética, como é o caso das culturas resistentes aos herbicidas. A resistência aos herbicidas em plantas cultivadas pode ser adquirida por meio de manipulação gênica sendo os métodos divididos em transgênicos e em não-transgênicos (ROSO & VIDAL, 2011). O primeiro caso consiste em um processo artificial de inserção de um gene de interesse promovendo insensibilidade ao local de ação, superexpressão da enzima-alvo ou metabolização do herbicida (DUKE & POWLES, 2008).

Os métodos não-transgênicos caracterizam-se basicamente pela busca de mutantes (TAN *et al.*, 2005). A seleção de indivíduos mutantes pode ser por meio de variação somaclonal, mutação induzida, seleção de células ou sementes contendo mutações, e ainda por meio de hibridização simples (DUKE & POWLES, 2008). Métodos não-transgênicos são utilizados com maior frequência no desenvolvimento de culturas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS (TAN *et al.*, 2006).

Outro processo responsável pela origem da resistência é o fluxo gênico. Fluxo gênico engloba etapas como a polinização entre espécies sexualmente compatíveis, seguido de introdução de alelos ou genes novos em uma população receptora, a partir de outra população (GEALY *et al.*, 2003). Algumas culturas possuem espécies silvestres relativas onde pode haver compatibilidade sexual. O fluxo gênico das culturas para os tipos silvestres adiciona novos genes a essas plantas introduzindo combinações inéditas. Estas combinações podem ocasionar impacto substancial na evolução das populações silvestres, resultando em plantas daninhas mais agressivas (COLWELL *et al.*, 1985; ARIAS & RIESEBERG, 1994; ARRIOLA & ELLSTRAND, 1997) e/ou em plantas daninhas resistentes aos herbicidas.

Podem ser citados exemplos clássicos de fluxo gênico, como por exemplo, hibridização entre o sorgo cultivado (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e o sorgo selvagem (*Sorghum propinquum* (Kunth) Hitchc.), resultando em uma das principais espécies de planta daninha no mundo o capim-massambará (*Sorghum halepense* (L.) Pers), (PATERSON *et al.*, 1995). Ainda, pode-se citar o caso crítico de arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas via fluxo gênico entre cultivares de arroz Clearfield® (GEALY *et al.* 2003; ZHANG *et al.* 2006; SHIVRAIN *et al.* 2007; ROSO *et al.*, 2010; GOULART *et al.*, 2012).

O fluxo de genes ocorre tanto via pólen quanto por meio de sementes. Em geral, o fluxo gênico via pólen ocorre em distâncias relativamente curtas, pois o pólen é viável por apenas algumas horas ou dias. A circulação de sementes, no entanto, pode ocorrer em qualquer ponto desde o início do plantio até o destino final da safra (VENCILL *et al.*, 2012).

Evolução independente, manipulação gênica e fluxo gênico são três casos que explicam a origem da resistência aos herbicidas nas plantas. Uma vez

resistente, existem processos fisiogenéticos que alteram a fisiologia da planta acarretando na resistência. Esses processos fisiogenéticos são denominados mecanismos de resistência aos herbicidas.

#### **2.3.4 Mecanismos de resistência aos herbicidas**

Os mecanismos de resistência aos herbicidas dividem-se em mecanismos onde ocorrem alterações na enzima alvo do herbicida (TSR - '*target-site resistance*') e em mecanismos que não envolvem o local de ação alterado (NTSR- '*non-target site*') (POWLES & YU, 2010).

TSR envolvem alterações no gene que codifica a proteína alvo do herbicida causando redução direta na eficácia da ação do herbicida sobre o seu alvo (DÉLYE *et al.*, 2013). Estas alterações podem ser mutações no gene, superexpressão de proteínas ligadas à enzima alvo (POWLES & SHANER, 2001) e multicópias da enzima alvo (GAINES *et al.*, 2010).

NTSR incluem processos de absorção e/ou translocação reduzida do herbicida, compartimentalização do produto (ROSO & VIDAL, 2010) e metabolização acentuada. NTSR é considerado '*the dark side*' da resistência, porque muito pouco se sabe sobre ele em comparação com TSR (DÉLYE *et al.*, 2013). O mecanismo de resistência predominante em plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS é TSR devido a ocorrência de mutações no gene ALS (TRANEL & WRIGHT, 2002; McNAUGHTON *et al.*, 2005; CHRISTOFFERS *et al.*, 2006; WHALEY *et al.*, 2007).

Plantas daninhas são capazes de se adaptar as mais diferentes situações e evoluem as mais inusitadas condições em prol da manutenção da sua sobrevivência. *Lolium rigidum* com resistência múltipla (resistência a mais de um modo de ação herbicida) a glifosato, ACCase e paraquat, exemplifica bem essa

condição. Nesta planta daninha foram identificados mais de um mecanismo de resistência, mutações no gene alvo e translocação reduzida (YU *et al.*, 2007).

Casos de resistência múltipla somados a diferentes mecanismos de resistência podem resultar em efeitos aditivos nos níveis de resistência tornando o manejo destas plantas ainda mais difícil. *E. heterophylla* também é um caso de resistência múltipla (TREZZI *et al.*, 2005).

## **2.4 Resistência em *E. heterophylla***

Neste item serão abordados aspectos da resistência aos herbicidas na planta daninha *E. heterophylla* destacando a resistência cruzada e múltipla nesta espécie.

### **2.4.1 Resistência cruzada**

Resistência cruzada ocorre pela alteração bioquímica no local de ação do herbicida conferindo resistência a diferentes grupos químicos dentro do mesmo modo de ação (POWLES & PRESTON, 1998). Adicionalmente, a metabolização de herbicidas também pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência cruzada.

A resistência cruzada não confere necessariamente resistência de todos os herbicidas com o mesmo local de ação e ainda podem existir variações nos níveis de resistência dentro dos grupos químicos (AGOSTINETO & VARGAS, 2009). Por definição este tipo de resistência é conferido por um único mecanismo de resistência (BECKIE & TARDIF, 2012). Um único gene é responsável por um único mecanismo, entretanto mais de um gene também pode contribuir para o mesmo mecanismo de resistência (PRESTON & MALLORY-SMITH, 2001), como no caso de metabolização.

Exemplos de plantas daninhas com resistência cruzada podem ser citados como biótipos de *Bidens pilosa* resistentes a dois grupos químicos dos inibidores de ALS (MONQUERO & CHRISTOFFOLETI, 2001). Também *Bidens subalternans* resistente aos quatro grupos químicos de inibidores de ALS (LAMEGO *et al.*, 2009b). A resistência aos inibidores da ALS deve-se majoritariamente a ocorrência de mutações no gene ALS.

Acetolactato sintase (ALS; EC 4.1.3.18; AHAS, acetohidroxiácido sintase) catalisa o primeiro passo na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (MAZUR *et al.*, 1987). Plantas e microorganismos conseguem sintetizar os esqueletos de carbonos destes aminoácidos a partir de piruvato (valina), piruvato mais acetil-CoA (leucina) ou piruvato mais 2-cetobutirato (isoleucina) (DUGGLEBY *et al.*, 2008).

Atualmente foram identificados no gene ALS de levedura, bactéria e plantas pelo menos 22 posições de aminoácidos em que foram encontradas mutações responsáveis por conferir resistência aos herbicidas (Gly-121, Ala-122, Met-124, Arg-142, Val-196, Pro-197, Arg-199, Ala-205, Phe-206, Lys-256, Met-351, His-352, Arg-373, Asp-375, Asp-376, Arg-377, Met-570, Val-571, Trp-574, Phe-578, Ser-653 and Gly-654) (POWLES & YU, 2010; MASSA *et al.*, 2011). Nas espécies de plantas daninhas 8 destas posições (sublinhadas acima) totalizam 24 substituições de aminoácidos identificadas (TRANEL *et al.*, 2011, HAN *et al.*, 2012).

Os herbicidas inibidores da ALS compreendem 5 grupos químicos: sulfoniluréias (SU) (CHALEFF & MAUVAIS, 1984), imidazolinonas (IMI) (SHANER *et al.*, 1984), pirimidiniltio-benzoatos (PTB) (STIDHAM, 1991), triazolpirimidinas (TP) (GERWICK *et al.*, 1990) e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (SCT) (SANTEL *et al.*, 1999). O padrão de resistência cruzada pode ser definido de

acordo com a mutação presente no biótipo, como por exemplo, a ocorrência da mutação Trp-574 confere resistência aos 4 grupos enquanto Pro-197 confere resistência a SU e a IMI (TRANEL & WRIGHT, 2002; YU *et al.*, 2003; PRESTON *et al.*, 2006).

Desta forma definiu-se uma relação entre os grupos químicos de herbicidas inibidores da enzima ALS e a substituição específica (mutação) relativa a posição do aminoácido na enzima ALS afetada (SHANER, 1999). Essa relação entre alteração no local de ação versus nível de resistência por grupo químico foi recentemente revisado (BECKIE & TARDIF, 2012).

#### **2.4.2 Resistência múltipla**

A resistência múltipla é um problema de maior complexidade. Neste caso a planta daninha é resistente a diferentes modos de ação de herbicidas (AGOSTINETO & VARGAS, 2009). Comumente este tipo de resistência é atribuído a dois ou mais mecanismos de resistência envolvidos (BECKIE & TARDIF, 2012).

Cada vez mais casos de plantas daninhas com resistência múltipla são identificados (FOES *et al.*, 1998; TREZZI *et al.*, 2005; PATZOLDT *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2007; LEGLEITER *et al.*, 2008; KRUGER *et al.*, 2009; MALIK *et al.*, 2010; DÉLYE *et al.*, 2011; SENG *et al.*, 2011; SOSNOSKIE *et al.*, 2011). Esse fato evidencia a forte capacidade de adaptação frente às condições de manejo impostas.

No Brasil das 31 espécies de plantas daninhas resistentes, oito apresentam resistência múltipla: *E. heterophylla* (aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX) (TREZZI *et al.*, 2005); *E. heterophylla* (aos herbicidas inibidores da ALS e EPSPS) (VIDAL *et al.*, 2007); *Bidens subalternans* (aos herbicidas inibidores da ALS e aos herbicidas inibidores do fotossistema II - PSII) (HEAP, 2013); *Echinochloa*

*crusgalli* (aos herbicidas inibidores da ALS e auxinas sintéticas) (HEAP, 2013); *Sagittaria montevidensis* (aos herbicidas inibidores da ALS e PSII) (EBERHARDT & NOLDIN, 2011); *Lolium multiflorum* (aos inibidores da ACCase e EPSPS) (HEAP, 2013); *Conyza sumatrensis* (aos inibidores da ALS e EPSPS) (HEAP, 2013); *Amaranthus retroflexus* (aos inibidores da ALS e PSII) (HEAP, 2013); e *Amaranthus viridis* (aos inibidores da ALS e PSII) (HEAP, 2013).

### **2.4.3 E. heterophylla com resistência múltipla**

A resistência múltipla em *E. heterophylla* foi identificada pela primeira vez no Brasil em 2004 (TREZZI *et al.*, 2005). Esse fato, preocupante por si só, tem o agravante de ser o sexto caso no mundo de planta daninha resistente aos inibidores de PROTOX e o primeiro caso brasileiro de resistência a mais de um mecanismo de ação. Até então, os casos de resistência aos herbicidas inibidores de PROTOX estavam restritos aos biótipos de *Amaranthus* spp, identificados nos estados do Kansas e Illinois (SHOUP *et al.*, 2003), nos Estados Unidos.

Protoporfirinogênio oxidase (PROTOX, EC 1.3.3.4), também denominada PPO em algumas literaturas, é uma enzima chave na síntese de compostos tetrapirróis e catalisa a oxidação de protoporfirinogen IX (Protogen) para protoporfirina IX (Proto) (LERMONTOVA *et al.*, 1997). A inibição de PROTOX leva a formação de protoporfirina IX, altamente fotossensível, gerando a formação de oxigênio singlete causando peroxidação de lipídeos e morte celular (LERMONTOVA *et al.*, 1997).

Casos de resistência como o de *E. heterophylla* geram bastante apreensão no meio agrícola, pois os principais herbicidas alternativos, seletivos para culturas como a soja, para controle de plantas resistentes aos inibidores da ALS em pós-emergência são compostos que inibem a enzima PROTOX (MEROTTO Jr. & VIDAL, 2001). Esse cenário reflete a dificuldade dos agricultores no manejo

destas plantas resistentes, sendo necessária a adoção de formas alternativas de controle que por muitas vezes acarretam em custos de produção mais elevados.

Na tentativa de contornar essa questão, sojicultores brasileiros com problemas de leiteira resistente aos inibidores da ALS e/ou com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, vêm utilizando soja com o gene Roundup Ready (RR). Porém, a soja RR já não é uma solução para o problema, uma vez que biótipos de EPHHL também com resistência múltipla foram identificados no RS, porém neste caso a resistência ocorre aos inibidores da ALS e ao herbicida glyphosate (VIDAL *et al.*, 2007).

A evolução da resistência múltipla em *E. heterophylla* sugere possivelmente a ocorrência de diferentes mecanismos de resistência (TREZZI *et al.*, 2005). Evidências apontam a ocorrência de mecanismos que não envolvem o local de ação alterado em biótipos de EPHHL com resistência múltipla aos inibidores de ALS e PROTOX (R ALS/PPO) (TREZZI *et al.*, 2009). Possivelmente o mecanismo que determina a resistência aos inibidores de PROTOX nestes biótipos com resistência múltipla, estaria relacionado aos mecanismos de absorção e/ou translocação e talvez estivessem sinergizando-se nos biótipos R ALS/PPO, ampliando o grau de resistência dos mesmos e dificultando seu controle no campo.

Diferentes métodos de manejo podem ser utilizados visando mitigar a evolução da resistência aos herbicidas. Entretanto, quando a resistência de plantas daninhas já está presente, é necessário conhecer as características biológicas dos biótipos resistentes e suscetíveis, bem como sua adaptabilidade ecológica visando o desenvolvimento de estratégias alternativas de manejo (VIDAL, 2007).



## 2.5 Adaptabilidade ecológica - Germinação

A probabilidade de infestação de uma área com indivíduos resistentes depende de vários fatores, como a adaptabilidade ecológica (MAXWELL *et al.*, 1990). A adaptabilidade ecológica é a combinação de características de crescimento, sobrevivência e produção de sementes viáveis (HOLT & RADOSEVICH, 1983). Deste modo, o estudo do processo de germinação em biótipos resistentes aos herbicidas auxilia na compreensão da evolução da resistência nestas plantas daninhas, bem como informações adicionais de adaptabilidade são importantes para traçar estratégias alternativas de manejo.

Para que medidas de prevenção e manejo possam ser recomendadas de forma racional e com base em informações consistentes de previsão da evolução da resistência em populações de plantas daninhas, é necessário que o comportamento biológico dos biótipos suscetíveis e resistentes seja caracterizado (GILL *et al.*, 1996). De forma geral, mundialmente não se têm observado penalidades de adaptação de biótipos de plantas daninhas resistentes aos inibidores de ALS (SYBONI & RUBIM, 2003; CROOKS *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2004; MASSINGA *et al.*, 2005; DUFF *et al.*, 2009; LAMEGO *et al.*, 2011). Estes resultados indicam que na ausência do herbicida, o biótipo resistente permanece na população com frequência similar ao biótipo suscetível. Penalidades de adaptação foram relatadas em *Amaranthus powelli* resistente aos inibidores da ALS (TARDIF *et al.*, 2006).

Biótipos resistentes as triazinas foram menos vigorosos do que os biótipos suscetíveis da mesma espécie (VAUGHN, 2003). Resultados similares foram encontrados em *Datura stramonium* L., *Amaranthus* spp., *Brassica napus* L., *Chenopodium album* L., *Senecio vulgaris* L. e em *Poa annua* L. (McCLOSKEY &

HOLT, 1990; WARWICK, 1991). Estes resultados mostraram que o gene de resistência as triazinas possuem penalidades de adaptação.

No Brasil, características morfofisiológicas e adaptabilidade ecológica de biótipos de EPHHL resistentes aos inibidores da ALS foram comparadas com o biótipo suscetível e não se observou prejuízo ao desenvolvimento do biótipo resistente (VIDAL & TREZZI, 1999; TREZZI & VIDAL, 2000; BRIGHENTI *et al.*, 2001). No entanto, ainda é desconhecido o comportamento dos biótipos de EPHHL com resistência simultânea aos inibidores da ALS e PROTOX, em relação as características de adaptabilidade ecológica.

O estudo do tipo de resistência somados ao mecanismo e a adaptabilidade ecológica constituem aspectos importantes para definir estratégias de manejo em áreas com biótipos resistentes. Além destes fatores o estudo genético, molecular e evolutivo também constituem aspectos importantes para o manejo e prevenção da evolução da resistência de plantas daninhas aos herbicidas.

## **2.6 Genética e biologia molecular na evolução da resistência**

Existem diversos fatores relacionados à população de plantas que interagem e determinam a probabilidade e o tempo de evolução da resistência, dentre os quais se destacam: número de alelos envolvidos na expressão da resistência; frequência do(s) alelo(s) da resistência na população inicialmente suscetível; modo de herança do(s) alelo(s) da resistência (materna ou paterna); características reprodutivas da espécie; pressão de seleção; e taxa de cruzamentos entre biótipos resistentes e suscetíveis (MORTIMER, 1998).

### **2.6.1 Número de genes envolvidos na resistência**

O conhecimento do número de genes que envolvem a resistência aos herbicidas é importante. A frequência de alelo de resistência nas populações

nativas geralmente está entre  $10^{-16}$  e  $10^{-6}$  (MORTIMER, 1998), e, quanto maior for a frequência do alelo, maior será a probabilidade de seleção de um biótipo resistente (JASIENIUK *et al.*, 1996). Ainda, um alelo dominante raro tem maior probabilidade de fixar-se em uma população de plantas daninhas do que um alelo recessivo, após o tratamento herbicida. O papel dos genes dominantes na evolução adaptativa se destaca, principalmente, se a espécie é forçada a adaptar-se rapidamente a uma nova e elevada pressão de seleção (MERREL, 1981).

O efeito de gargalo da garrafa é um evento evolutivo no qual uma percentagem significativa da população de uma espécie morre ou é impedida de se reproduzir (DOORDUIN *et al.*, 2010). Neste caso em particular esse efeito faz aumentar a deriva genética numa população, ou seja, ocorrem modificações na frequência dos alelos e a predominância de certas características na população. O efeito de gargalo pode ocorrer com a aplicação de herbicida na população suscetível.

A relação da genética de populações com resistência de plantas daninhas pode ser descrita da seguinte maneira: a população suscetível expressa elevada variabilidade genética e quando sofre o processo de seleção devido a sucessivas aplicações do herbicida restam apenas poucos indivíduos na população caracterizando o efeito de gargalo, logo populações resistentes irão apresentar baixa variabilidade genética.

A variabilidade genética de populações de *Chenopodium album* resistente aos herbicidas inibidores do fotossistema II foi investigada por meio da utilização de 416 marcadores do tipo AFLP (APER *et al.*, 2010). Os resultados mostraram menor variação genética nos biótipos resistentes quando comparados aos biótipos suscetíveis, comprovando a ação do efeito gargalo.

Quanto maior a diversidade de genes entre populações, maior será a probabilidade de selecionar alelos resistentes frente à pressão de seleção imposta pelo herbicida (WINKLER *et al.*, 2002). No caso de *E. heterophylla*, estudos identificaram alta diversidade genética dentro e entre populações avaliando o loco da  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase em 12 populações (FRIGO *et al.*, 2009). Analisando 40 populações de EPHHL resistentes aos inibidores da ALS, foi possível concluir que há variabilidade genética quanto à resistência, pois o coeficiente de similaridade encontrado entre estas populações foi de 40% (WINKLER *et al.*, 2003).

Muitos exemplos da evolução adaptativa em populações de plantas e animais são observados pela seleção de fenótipos devido ao resultado de muitos genes (poligenes), cada um com pequeno efeito (LANDE, 1983). Isto ocorre devido ao fato de que mutações com efeitos menores estão presentes nas populações a frequências mais elevadas do que aquelas com efeitos maiores, as quais podem ser deletérias ou pleiotrópicas (LANDE, 1983). A maioria dos casos estudados de resistência em plantas daninhas aos herbicidas demonstra que esta característica tem sido causada por um único gene de grande efeito (VARGAS *et al.*, 2001; VOLENBERG & STOLTENBERG, 2002; WANG *et al.*, 2003).

### **2.6.2 Herança da resistência**

O tipo de herança é outro aspecto fundamental na evolução da resistência em uma população de plantas. Há dois tipos básicos de herança: a citoplasmática (materna), onde os caracteres hereditários são transmitidos via citoplasma (mitocôndria e cloroplasto) e, a nuclear, onde a herança é transmitida via cromossomos nucleares; neste caso, tanto o genitor feminino como o masculino pode transmitir a resistência. Dentre os casos de resistência registrados no mundo até hoje, apenas biótipos de plantas daninhas resistentes às triazinas

apresentam herança citoplasmática, enquanto os demais são de herança nuclear (POWLES & SHANER, 2001).

Mutações na enzima ALS, por exemplo, têm sido observadas como dominantes ou parcialmente dominantes, sendo a herança de gene nuclear (TRANSEL & WRIGHT, 2002). Nas espécies daninhas *Lactuca* spp. e *Solanum nigrum* (L.), a resistência aos inibidores de ALS é controlada por um único gene nuclear, com dominância incompleta (MALLORY-SMITH *et al.*, 1990; VOLENBERG & STOLTENBERG, 2002).

Um único gene nuclear com dominância incompleta também controla a resistência aos inibidores de ACCase na espécie *Solanum ptychanthum* (ASHIGH *et al.*, 2008). A resistência ao herbicida quinclorac e aos inibidores de ALS em *Galium spurium* é conferida por dois genes distintos sendo um recessivo e o outro dominante, respectivamente (EERD *et al.*, 2004). A herança da resistência ao herbicida 2,4-D em *Lactuca serriola* (L.) é governada por um único gene codominante (RIAR *et al.*, 2011). Biótipos de *Lolium rigidum* com mecanismo de resistência por metabolização (P450) mostraram ser a herança governada por um único gene nuclear dominante (BUSI *et al.*, 2011).

A herança da resistência na espécie *E. heterophylla* foi investigada apenas em biótipos resistentes aos inibidores da ALS sendo governada por um gene dominante nuclear com dominância completa (VARGAS *et al.*, 2001). A herança aos inibidores da ALS em biótipos com resistência múltipla ainda não foi investigada.

### **2.6.3 Implicações do nível de ploidia na resistência**

A poliploidia pode ser definida como a existência de mais de dois genomas no mesmo núcleo, foi descoberta no ano de 1907 e é considerada a principal força evolutiva em plantas (GRANT 1971; HOVAV *et al.*, 2008; WOOD *et al.*,

2009). A grande maioria dos eucariotos possuem histórias de eventos de poliploidização em seus ancestrais pela diploidização seguido de poliploidizações repetidas (SALMON & AINOUCHE, 2010).

A poliploidia é provavelmente a alteração citogenética mais importante na especiação e evolução vegetal (WITTMANN, 2004). Também é considerada a maior força evolutiva em plantas (MUNTZING, 1936; LEWIS, 1980a, b) porque acarreta, em nível populacional, a diferenciação no modo reprodutivo e/ou hábitat. As plantas poliplóides também são úteis na genômica funcional para o estudo da expressão de genes em um complexo '*background*' genético (YANG *et al.*, 2011). Estima-se que grande parte das espécies daninhas sejam poliploides.

A natureza poliploide de algumas espécies daninhas torna o estudo da resistência aos herbicidas um processo mais complexo, pois mutações específicas teriam a oportunidade de ocorrer em dois ou mais genomas (CHRISTOFFERS, 1999). Para uma espécie daninha alopoliploide, ou seja, formada a partir de duas espécies diploides, a dispersão da resistência, uma vez dominante, não será tão rápida quanto para um autopoliploide (originados a partir da duplicação do próprio genoma da espécie) devido aos autopoliploides possuírem na geração seguinte, freqüência fenotípica semelhante a espécies diploides, o que não ocorre com os alopoliploides (WANG *et al.*, 2003).

A natureza poliploide de *E. heterophylla* poderia explicar a evolução da resistência nesta espécie bem como os mecanismos envolvidos na herança deste caráter. Estudos conduzidos identificaram diferentes números cromossômicos em *E. heterophylla* ( $2n = 14, 26, 28, 32$  ou  $56$ ) (HANS, 1973). A tetraploidia nesta espécie foi determinada pela contagem do número cromossômico em células somáticas ( $2n=28$ ) e assumindo número básico  $X=7$  (SUDA, 2001). Em outro

trabalho, também foi identificado o mesmo número cromossômico (AARESTRUP *et al.*, 2008a).

O número cromossômico também foi determinado em outras espécies do gênero *Euphorbia* L. (SHEIDAI *et al.*, 2010). Foi possível determinar espécies diploides como *E. spinidens*, *E. marschalliana*, *E. bungei*, *E. buhsei* e *E. szovitsii* ( $2n=2x=20$ ) e *E. orientalis* ( $2n=2x=18$ ), assim como espécies tetraploides como *E. helioscopia* com  $2n=4x=42$  (SHEIDAI *et al.*, 2010). A análise de 131 biótipos de *E. esula* mostrou que todas as plantas analisadas foram hexaploides ( $2n=6X=60$ ) (STAHEVITCH *et al.*, 1988). Outra espécie diploide estudada foi *E. palustris* ( $2n=2x=20$ ) (WARNER *et al.*, 2011). A literatura mostra diversidade em relação ao nível de ploidia para espécies do gênero *Euphorbia* L. A natureza poliploide de *E. heterophylla* ainda não foi caracterizada, nem foi analisada sua relação com a resistência múltipla aos herbicidas.

## **2.7 Determinação do nível de resistência por meio de curvas de dose-resposta**

O diagnóstico de plantas daninhas resistentes em uma lavoura é essencial para nortear modificações no seu manejo. Este diagnóstico deve ser inequívoco e rápido permitindo maior agilidade e maior eficiência das medidas a serem implantadas. O primeiro passo na caracterização do biótipo resistente (R) requer uma detalhada curva de dose-resposta em que as doses utilizadas variam de 10 a 1000 vezes da dose que seria letal ao biótipo suscetível (S) e a resposta da planta ao herbicida é baseada em análise visual, mortalidade, inibição do crescimento em relação à testemunha não tratada (BECKIE *et al.*, 2000). A resistência é confirmada quando a curva dose-resposta dos biótipos é estatisticamente

diferente e o biótipo R não é mais controlado com as doses que controlam o biótipo S (BECKIE *et al.*, 2000).

Ensaio realizados em casa-de-vegetação de curva dose-resposta correspondem a experimentos clássicos para identificar ou confirmar casos de resistência. Nestes ensaios, sementes dos biótipos sob suspeita são coletadas, semeadas e quando as plantas alcançam à fase de desenvolvimento adequada à aplicação do herbicida (em geral de duas a quatro folhas completamente expandidas) é realizada a aspersão dos herbicidas nas diversas doses e os resultados são comparados com biótipos sabidamente suscetíveis (GAZZIERO *et al.*, 1998; VIDAL & TREZZI, 1999; GAZZIERO *et al.*, 2000).

Os resultados das avaliações de curva dose-resposta destes testes são frequentemente baseados em ajustes de modelos de regressão não linear, como os descritos por STREIBIG *et al.* (1993) e BRAIN & COUSENS (1989). Dois modelos para curvas de dose-resposta sigmoidais são amplamente utilizados, o modelo logístico e o modelo de Gompertz (RITZ & STREIBIG, 2005). Destes, o modelo log-logístico, no qual se utilizam parâmetros que são biologicamente significativos quando aplicados à resposta da planta ao herbicida, é o mais apropriado na análise da maioria dos estudos de dose-resposta (SEEFELDT *et al.*, 1998). O modelo logístico de quatro parâmetros é dado pela fórmula:

$$f(x, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

em que  $f(x)$  representa a variável dependente a ser estimada,  $d$  representa o limite superior da curva,  $c$  representa o limite inferior,  $b$  é a inclinação da curva no ponto em que esta produz a metade da resposta entre os valores inferior e superior e o parâmetro  $e$ , também conhecido como GR50, é a dose em que é



produzida metade da resposta entre os limites inferior e superior (RITZ & STREIBIG, 2005).

Por estes modelos é possível encontrar a dose responsável por controlar 50% dos biótipos (C50) ou a dose que reduz 50% da massa seca de plantas (GR50), ou ainda, a redução da atividade enzimática (I50) em 50% (LAMEGO, 2008). O fator de resistência (FR) é obtido pela relação do C50, GR50 ou I50 entre o genótipo resistente e o suscetível, expressando quantas vezes que o genótipo R é mais resistente que o S (HALL *et al.*, 1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia será composta por experimentos relacionados a hipótese e objetivo, citados no presente trabalho. Cada experimento foi denominado de linha de estudo (LE). Inicialmente, será caracterizada o local de origem da resistência aos herbicidas em *E. heterophylla*. Posteriormente, serão abordados os procedimentos realizados com o detalhamento de cada linha de estudo.

O padrão de resistência cruzada aos cinco grupos dos herbicidas inibidores da enzima ALS determinado por meio de curvas de dose-resposta e ensaio enzimático *in-vivo* constituem a LE1. A seguir serão descritos aspectos genéticos da resistência como a herança do gene ALS (LE2), citogenética (LE3) e estudos moleculares (LE4). Também será relatado o estudo de uma importante característica de adaptação ecológica que é o estudo da germinação de sementes com diferentes idades (LE5).

Finalizando este trabalho será discutido a possibilidade da ocorrência de resistência tríplice desta espécie ao herbicida glifosato por meio de estudos de curvas de dose resposta e por meio de experimentos de translocação e absorção monitorados pelo herbicida glifosato radiomarcado (C<sup>14</sup>-Glifosato) (LE6).

#### 3.1 Material Vegetal

Os biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS (R ALS), resistentes aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX (R ALS/PPO) e

os biótipos suscetíveis (S) foram coletados, respectivamente, em áreas de lavoura de soja pertencentes aos municípios de Pato Branco ( $26^{\circ}13'44''$  Sul de latitude e  $52^{\circ}40'15''$  Oeste de longitude), Vitorino ( $26^{\circ}16'37''$  S,  $52^{\circ}47'2''$  O) e Renascença ( $26^{\circ}09'29''$  S,  $52^{\circ}58'08''$  O), todos localizados na região sudoeste do Paraná (TREZZI *et al.*, 2009) (Figura 1). A confirmação dos biótipos com resistência aos inibidores da ALS e dos biótipos com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX foi documentada, respectivamente, por Trezzi *et al.* (2005) e Trezzi *et al.* (2006).

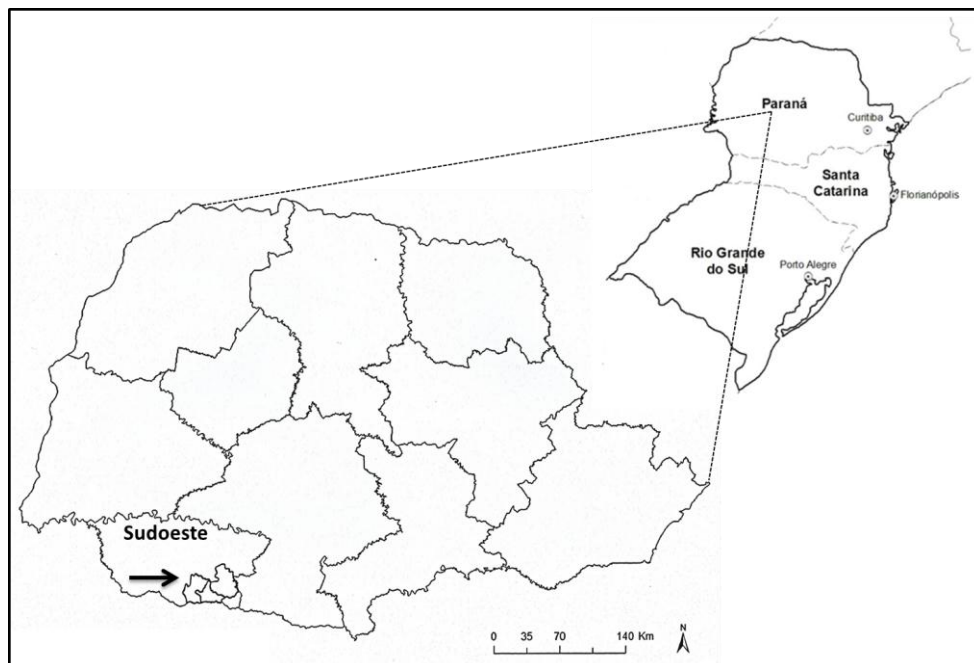


FIGURA 1. Mesorregiões do estado do Paraná destacando a região sudoeste como o local de origem dos biótipos de *E. heterophylla* resistentes aos inibidores da enzima ALS, com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX e a origem do biótipo suscetível. A seta indica a localização dos municípios de Renascença, Vitorino e Pato Branco de onde o material vegetal foi coletado. Porto Alegre-RS, 2013.

### 3.2 Resistência cruzada aos inibidores da ALS (LE1)

A confirmação da resistência assim como a verificação da ocorrência de resistência cruzada nos biótipos suscetível, resistente a ALS e com resistência múltipla foi determinada por meio de experimentos de curvas de dose-resposta sob o crescimento de plantas e via ensaios enzimáticos *in vivo*.

### 3.2.1 Curvas de dose-resposta aos inibidores da ALS

Os experimentos de curva de dose-resposta foram realizados em casa de vegetação do Laboratório da Flora Ruderal (LaFlor), localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre-RS e em casa de vegetação na University of Arkansas, Fayetteville-AR (USA).

No Brasil foram conduzidos os experimentos para os herbicidas imazetaphyr, nicosulfuron, bispyribac-sodium e cloransulam-methyl sendo estes representantes dos respectivos grupos químicos: imidazolinonas (IMI), sulfoniluréias (SU), pirimidiltiobenzoatos (PTB) e triazolopirimidinas (TP). Nos EUA foi conduzido o ensaio de curva dose-resposta para o herbicida flucarbazone sendo este pertencente ao grupo químico sulfonil-aminocarbonil-triazolinona (SCT). O motivo da realização desta etapa nos EUA é o fato deste herbicida não ser comercializado no Brasil.

No Brasil os experimentos foram conduzidos utilizando vasos com capacidade volumétrica de 300 mL preenchidos com mistura de solo e areia na proporção 3:1. Uma planta foi estabelecida por vaso. As condições de crescimento foram médias de entre 38/21°C de temperatura do ar e 52% de umidade relativa. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água para manter o solo constantemente irrigado por capilaridade.

O solo foi coletado na Estação Experimental Agronômica da UFRGS localizada no município de Eldorado do Sul-RS (EEA/UFRGS). A coleta foi realizada em camada de 0 a 10 cm do perfil do solo em área sem contaminação com herbicidas. A análise química mostrou que o solo utilizado contém 280 g Kg<sup>-1</sup> de argilas, 15 g Kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, fósforo livre superior a 100 mg L<sup>-1</sup>,

potássio trocável superior a  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , CTC efetiva igual a  $15 \text{ cmol}^{-1}$  e pH em água igual a 6,0.

As doses utilizadas foram diferentes entre o biótipo S e os biótipos R ALS e R ALS/PPO (Tabela 1). Todos os tratamentos herbicidas foram acrescidos de surfactante, com exceção do herbicida nicosulfurom. Para imazethapyr adicionou-se Assist a 0,05% v/v; para bispiribaque-sódico, Iharaguen-S a 0,25% v/v; e para cloransulam-metílico, Dash a 0,2% v/v. As aplicações dos herbicidas foram realizadas com pulverizador pressurizado a  $\text{CO}_2$  munido com bico do tipo leque com ponta 110.02, aplicando-se volume de calda correspondente a  $200 \text{ L ha}^{-1}$  e pressão de trabalho de 200 Kpa. No momento da aplicação a temperatura era de  $26^\circ\text{C}$  e umidade de 85%. O estágio de desenvolvimento das plantas por ocasião da aplicação era de quatro a seis folhas.

Para o herbicida flucarbazone o experimento foi conduzido utilizando vasos com capacidade volumétrica de 500 mL preenchidos com mistura comercial de substrato ("*Sunshine mix*"). Uma planta foi mantida por vaso. As condições de crescimento foram médias entre  $35/20^\circ\text{C}$  de temperatura do ar e 72% de umidade relativa. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água para manter o solo constantemente irrigado por capilaridade e mantidos em casa de vegetação até atingirem o estágio de quatro a seis folhas.

Foram aplicadas nove doses para o biótipo S variando de 0 até 1X a dose recomendada de flucarbazone ( $30 \text{ g ia} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) e nove doses para os biótipos resistentes variando de 0 até 40X a dose recomendada (Tabela 1). A todos os tratamentos foi acrescido surfactante não-iônico Induce na dose 0,25% v/v. Para a aplicação este herbicida utilizou-se câmara de aspersão equipada com três bicos do tipo leque 110.02, com volume de calda correspondente a  $187,8 \text{ L ha}^{-1}$  (20 GPA).

TABELA 1. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio de curva de dose-resposta em biótipos de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistentes (R) aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX. Porto Alegre-RS, 2012; Fayetteville-AR, 2013.

Herbicidas e grupo químico					
Biótipos	Doses (g i.a. ha <sup>-1</sup> )				
	imazethapyr <sup>1</sup> IMI	nicosulfuron <sup>2</sup> SU	bispyribac <sup>3</sup> PTB	cloransulam <sup>4</sup> TP	flucarbazone <sup>5</sup> SCT
S	0	0	0	0	0
	2	1.2	1	0.8	2
	4	2.4	2	1.6	4
	8	4.8	4	3.2	7.5
	16	9.6	8	6.4	15
	40	24	25	20	30*
	100*	60*	50*	40*	60
					120
R	0	0	0	0	0
	50	60*	50*	40*	7.5
	100*	120	100	80	15
	300	180	150	120	30*
	1000	240	200	160	60
	2000	300	250	200	120
	4000	360	300	240	179
					239
				300	

\*Dose recomendada;

<sup>1</sup>Vezir 106 SC, Milenia Agrociências;

<sup>2</sup>Sanson 40 SC, FMC Química do Brasil, Ltda;

<sup>3</sup>Nominee 400 SC, Ihara;

<sup>4</sup>Pacto 840 WG, Dow Agrosciences;

<sup>5</sup>Everest 70 WDG, Arysta Lifesciences.

Para todos os tratamentos o delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições, organizados em esquema fatorial hierárquico. Ao fator A foram atribuídos os biótipos de EPHHL (S, R ALS, R ALS/PPO), ao fator B os herbicidas e ao fator C as doses.

As avaliações de controle para todos os herbicidas foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT). O método utilizado foi o visual utilizando escala de notas de zero a 100% conforme o nível de injúria ocasionado pelo herbicida às plantas. A nota zero equivale a ausência de injúrias enquanto a nota 100% equivale à morte da planta. Aos 28 DAT a parte aérea das plantas foi coletada e colocada para secar em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72h, quando a massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas foi determinada.

### 3.2.2 Ensaio enzimático '*in vivo*'

Foram realizados ensaios enzimáticos *in vivo* para os herbicidas imazethapyr, chlorimuron-ethyl, pyriithiobac-sodium e cloransulam-methyl sendo estes respectivos representantes dos grupos químicos IMI, SU, PTB e TP. O herbicida flucarbazone (SCT) foi excluído deste experimento devido aos resultados observados no experimento de curva de dose-resposta.

Estes experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na University of Arkansas, Fayetteville-AR (USA).

Nestes experimentos realizou-se a mesma abordagem experimental citada anteriormente nos ensaios de curva dose-resposta sobre o crescimento de plantas até a etapa de aplicação dos herbicidas. Como é um ensaio enzimático *in vivo* é necessário anteriormente ao protocolo de extração da enzima a aplicação dos herbicidas sob diferentes níveis de doses.

Similarmente, os experimentos foram conduzidos utilizando vasos com capacidade volumétrica de 500 mL preenchidos com mistura comercial de substrato ("*Sunshine mix*"). Uma planta foi mantida por vaso. As condições de crescimento foram máxima e mínima de 35/11°C e médias de 24°C de temperatura do ar e 84% de umidade relativa. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água para manter o solo constantemente irrigado por capilaridade e mantidos em casa de vegetação até atingirem o estágio de quatro a seis folhas.

As doses utilizadas foram diferentes entre o biótipo S e os biótipos R ALS e R ALS/PPO (Tabela 2). Todos os tratamentos herbicidas foram acrescidos do surfactante não iônico induce a 0,25% v/v. Para a aplicação dos herbicidas utilizou-se câmara de aspersão equipada com três bicos do tipo leque 110.02,

com volume de calda correspondente a 187,8 L ha<sup>-1</sup> (20 GPA). Foi realizada a aplicação de um herbicida a cada dia.

TABELA 2. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio enzimático em biótipos de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistentes (R) aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX. Fayetteville-AR, 2013.

Herbicidas e grupo químico				
Biótipos	Doses (g i.a. ha <sup>-1</sup> )			
	imazethapyr <sup>1</sup> IMI	chlorimuron <sup>2</sup> SU	pyrithiobac <sup>3</sup> PTB	cloransulam <sup>4</sup> TP
<b>S</b>	0	0	0	0
	0,5	0,01	0,7	0,15
	2,5	0,1	3,5	0,75
	5	0,5	7	1,5
	25	1	35	7,5
	50	10	70	15
	<b>100*</b>	<b>20*</b>	<b>140*</b>	<b>30*</b>
<b>R</b>	0	0	0	0
	25	1	70	15
	50	5	<b>140*</b>	<b>30*</b>
	<b>100*</b>	10	350	60
	250	50	700	120
	500	100	3500	750
	5000	1000	7000	1500

\*Dose recomendada;

<sup>1</sup>Newpath 22,87% SC (solução concentrada), Basf;

<sup>2</sup>Classic 25% DF (grânulos dispersíveis), DuPont;

<sup>3</sup>Staple 85% SC (solução concentrada), DuPont;

<sup>4</sup>First Rate 84% WDG (grânulos dispersíveis em água), Dow Agrosiences.

Para todos os tratamentos o delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições, organizados em esquema fatorial hierárquico. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

O protocolo utilizado tem por base a inibição da enzima cetoácido reductoisomerase (KARI) (adaptado de GERWICK *et al.* 1993 e LAMEGO *et al.* 2009b). A enzima KARI catalisa a reação posterior a da enzima ALS na rota de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (Figura 2). O ácido ciclopropano dicarboxílico (CPCA) atua como inibidor de KARI levando ao acúmulo de acetolactato que sofre descarboxilação e forma acetoína. A acetoína reage com creatina e naphthol formando uma coloração rosada. Por este motivo este método também é chamado de método colorimétrico.



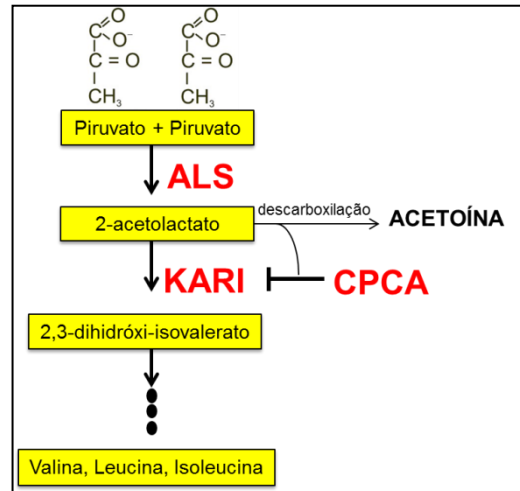


FIGURA 2. Rota de síntese simplificada dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A inibição de KARI pelo CPCA leva ao acúmulo de acetolactato que sofre descarboxilação e se transforma em acetoína. A acetoína reage com creatina e naphtol formando uma coloração rosada indicando a atividade enzimática da ALS. KARI: cetoácido reductoisomerase; CPCA: ácido ciclopropano dicarboxílico; ALS: acetolactato sintase. Porto Alegre-RS, 2013.

O CPCA foi aplicado três horas após a aplicação dos herbicidas. Testes preliminares foram realizados visando determinar o período mais adequado de tempo entre a inibição pelo CPCA até a extração enzimática. Níveis superiores de acetoína foram obtidos com o tempo de 48 horas após o tratamento (HAT) com CPCA. Deste modo, a atividade da enzima ALS foi avaliada 51 horas após a aplicação dos herbicidas através da quantificação de acetoína acumulada.

Passados 48 HAT com CPCA as plantas foram conduzidas ao laboratório para a extração protéica. Foram utilizados 0,8 g de tecido vegetal jovem sendo este imediatamente macerado em N<sub>2</sub> líquido após o corte. Após a maceração com o material não completamente congelado (descansar 1 min na bancada) foi adicionado 10 mL da solução 0,25% v/v do surfactante não-iônico Triton. Essa solução foi homogeneizada com o auxílio de um pistilo e após ocorreu a filtragem do homogeneizado. Essa etapa foi realizada com o auxílio de bomba a vácuo utilizando o filtro GF/C (Whatman). Aproximadamente 3 mL do

filtrado foi colocado em tubo falcon de 15 mL e acondicionado em gelo. Essa etapa pode ficar *overnight* desde que mantido em *ultrafreezer* ( $-60^{\circ}\text{C}$ ).

Após etapa de obtenção do extrato protéico foi realizada a etapa de reação enzimática propriamente dita. Para isto foi adicionado  $150\ \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6N nos tubos falcons contendo o extrato e agitado com vortex. O ácido sulfúrico tem a função de descarboxilar o acetolactato em acetoína. A mistura foi então incubada durante 30 min a  $60^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. Durante esse período de descarboxilação procedeu-se o preparo da solução colorimétrica contendo  $2\ \text{mg mL}^{-1}$  de creatina e  $20\ \text{mg mL}^{-1}$  de  $\beta$ -naphthol diluídos em NaOH 25M. Após 30 min de incubação 1 mL desta solução foi adicionada a mistura e agitada no vortex e voltou a incubação por mais 1 hora para o desenvolvimento da cor. Em seguida os tubos foram centrifugados a  $13.000\ \text{g}$  por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Após resfriar em temperatura ambiente a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Thermo Scientific) a  $530\ \text{nm}$ . O resumo da metodologia utilizada pode ser observada na Figura 3. Os dados foram expressos como porcentagem das plantas não tratadas com herbicidas.

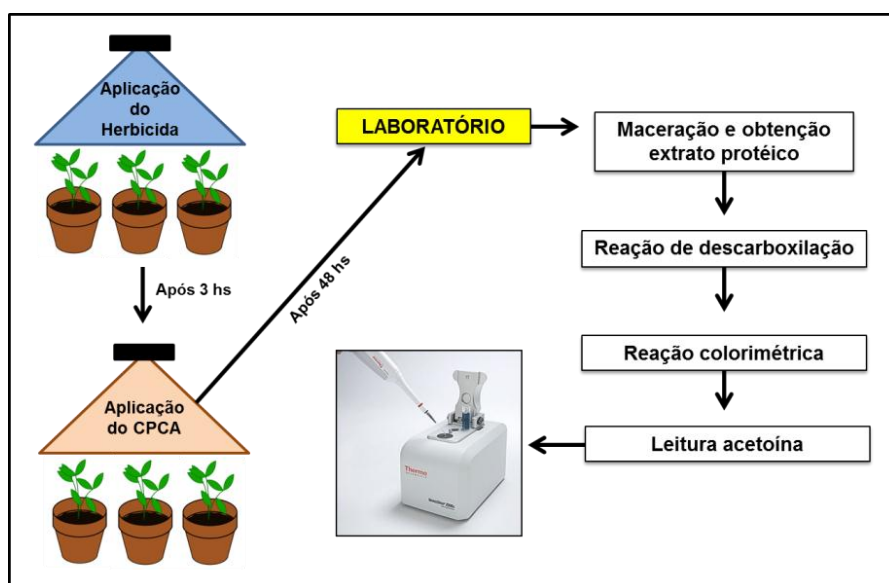


FIGURA 3. Resumo das etapas do protocolo de extração da enzima ALS *in vivo* por meio do método colorimétrico (adaptado de Gerwick *et al.* 1993 e Lamego *et al.* 2009b). Porto Alegre-RS, 2013.

### 3.2.3 Análise estatística

Ambos experimentos enzimáticos e curvas de dose-resposta sobre o crescimento de plantas foram realizados em replicatas. Deste modo, não havendo interação entre os tratamentos herbicidas e experimentos, os dados foram agrupados e analisados como um único experimento.

Os dados foram analisados quanto à homocedasticidade, sendo que na variável MSPA foi necessário a transformação dos dados para porcentagem em relação a testemunha não tratada. Para a variável atividade enzimática (I) os dados também foram expressos como porcentagem das plantas não tratadas com herbicidas.

Na variável controle os dados foram transformados utilizando (100 - controle). Neste caso esta transformação foi necessária para estimar valores precisos de  $C_{50}$  (equivale ao parâmetro  $X_{a_{50}}$  da equação 1), uma vez que a assíntota máxima para os biótipos será sempre 100%.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada através do teste F, adotando-se como limites de aceitação de significância o nível de 5% de probabilidade, tanto para efeitos individuais dos fatores quanto para a interação. A ANOVA foi realizada através do programa SAS (SAS, 1989).

As médias dos tratamentos entre os diferentes biótipos foram comparadas aplicando-se o teste da diferença mínima significativa (DMS) enquanto as médias dos tratamentos de um mesmo biótipo foram comparadas pelo desvio padrão da amostra (SE com  $n=4$ ). Os dados foram ajustados pela equação logística de quatro ou três parâmetros, através do programa Sigma Plot 11.0:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_{a_{50}}}\right)^b} \quad \text{ou} \quad Y = \frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_{a_{50}}}\right)^b} \quad \text{Equação 1.}$$

onde:  $Y$ = variável dependente (controle, MSPA, atividade enzimática);  $X$ = variável independente (dose do herbicida);  $a$ = assíntota máxima;  $Y_0$ =assíntota mínima;  $b$ = declividade da curva; e  $X_{a_{50}}$ = dose herbicida responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima ( $a$ ). Assim, foi possível calcular pela equação o valor da dose responsável por reduzir 50% do controle ( $C_{50}$ ), reduzir 50% a MSPA ( $GR_{50}$ ) e reduzir em 50% a atividade da enzima ALS ( $I_{50}$ ). O fator de resistência (FR) foi calculado através da razão entre o  $C_{50}$ ,  $GR_{50}$  e  $I_{50}$  do resistente (R) pelo suscetível (S) ( $C_{50}R/C_{50}S$ ,  $GR_{50}R/GR_{50}S$  e  $I_{50}R/I_{50}S$ ).

### **3.3 Herança do gene ALS (LE2)**

A descrição do material vegetal bem como a origem do mesmo está descrita detalhadamente no item 3.1 da descrição dos material e métodos desta tese. Na metodologia da LE2 serão apresentados os procedimentos para a geração dos parentais homozigotos bem como o detalhamento dos cruzamentos realizados para a obtenção das gerações F1 e F2. Adicionalmente será relatado como foi feito o estudo da segregação fenotípica com vistas a determinação da origem da resistência e o estudo da herança e dos níveis de resistência por meio de curvas dose-resposta.

#### **3.3.1 Geração dos parentais homozigotos**

A obtenção de parentais homozigotos foi realizada de acordo com Vargas *et al.* (2001). Para a obtenção dos parentais homozigotos foram realizadas autopolinizações tanto nos biótipos R ALS e R ALS/PPO, quanto no biótipo S. Inicialmente foram realizadas autopolinizações em aproximadamente 300 plantas por biótipo totalizando uma média de 1200 plantas autofecundadas.

As sementes produzidas de cada planta autopolinizada foram colhidas e armazenadas separadamente em geladeira (4°C) para a quebra de dormência. Para testar a homozigose foram semeadas 15 sementes de cada planta autopolinizada em vasos com capacidade volumétrica de 300 mL preenchidos com mistura de solo e areia na proporção 3:1. Quando atingiram o estágio de 4-6 folhas aplicou-se o herbicida imazethapyr na dose equivalente a 2X a recomendada (200 g i.a. ha<sup>-1</sup>) (Figura 4). Os parentais onde ocorreu morte de pelo menos uma das 15 plantas testadas foram descartados, sendo selecionados como parentais resistentes homozigotos apenas aqueles onde ocorreu a sobrevivência das 15 plantas testadas. Os parentais suscetíveis homozigotos foram selecionados onde ocorreu 100% de controle das plantas testadas.

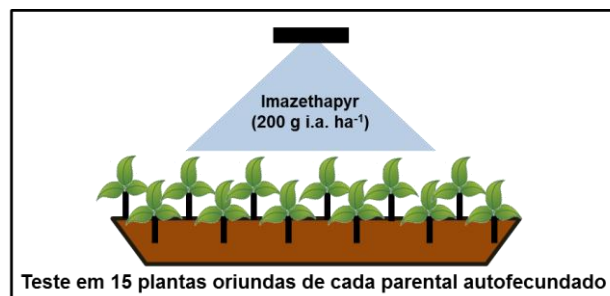


FIGURA 4. Geração dos parentais para os cruzamentos. A seleção de parentais homozigotos resistentes ocorreu quando 100% das plantas autofecundadas sobreviveram e os parentais homozigotos suscetíveis foram obtidos quando houve 100% de morte das plantas. Porto Alegre-RS, 2010.

### 3.3.2 Cruzamentos genéticos para obtenção F1 e F2

Os cruzamentos foram realizados conforme metodologia proposta por Vargas *et al.* (1999). A polinização entre os biótipos foi realizada de forma manual (Figura 5).



FIGURA 5. Esquema mostrando o procedimento de polinização manual utilizado nos cruzamentos para a obtenção da geração F1. Porto Alegre-RS, 2011.

Foram realizados os seguintes cruzamentos: ♀S x ♂R ALS e ♀S x ♂R ALS/PPO. As sementes de F1 foram semeadas em vasos e as plantas originadas destas sementes foram autofecundadas para obtenção da F2 (Figura 6).



FIGURA 6. Esquema dos cruzamentos realizados para a obtenção das gerações F1 e F2. Porto Alegre-RS, 2011.

### 3.3.3 Análise da segregação fenotípica

Para a análise da segregação fenotípica da resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS as sementes F1, F2 e dos parentais foram semeadas em bandejas grandes (8 x 31 x 50 cm) preenchidas da mistura de solo e areia na proporção 3:1; quando atingiram o estágio de 4-6 folhas aplicou-se o herbicida imazethapyr (200 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Avaliou-se a sua reação ao herbicida quanto a morte ou sobrevivência caracterizando as classes obtidas R e S, respectivamente. A frequência das classes foram testadas pelo teste do qui-quadrado.

A origem da resistência (nuclear ou mitocondrial) aos inibidores da ALS nesses biótipos foi verificada através da análise dos resultados da segregação fenotípica observada em relação a esperada. A probabilidade significativa dos valores obtidos superiores a 90% indica que a herança segue o padrão mendeliano de segregação. Desta forma, a herança é determinada como nuclear e o número de genes envolvidos também pode ser determinado.

#### **3.3.4 Determinação da herança e nível de resistência**

Para a determinação da herança foram realizados ensaios de curvas de dose-resposta sobre o crescimento de planta. Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do Laboratório da Flora Ruderal (LaFlor), localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre-RS.

Foram utilizados vasos com capacidade volumétrica de 300 mL preenchidos com mistura de solo e areia na proporção 3:1. Uma planta foi estabelecida por vaso. As condições de crescimento foram 38/21°C de temperatura do ar e 52% de umidade relativa do ar. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água para manter o solo constantemente irrigado por capilaridade.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições, organizados num esquema fatorial hierárquico. Ao fator A foram atribuídos os biótipos parentais (S, R ALS, R ALS/PPO) e a progênie F1 (♀S x ♂R ALS; ♀S x ♂R ALS/PPO), ao fator B as doses do herbicida imazetaphyr (S: 0, 2, 4, 8, 16, 40 e 100 g i.a. ha<sup>-1</sup>; R e F1: 0, 50, 100, 300, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Todos os tratamentos herbicidas adicionou-se Assist a 0,05% v/v. As aplicações dos herbicidas foram realizadas com pulverizador pressurizado a CO<sub>2</sub> munido com bico do tipo leque com ponta

110.02, aplicando-se volume de calda correspondente a 200 L ha<sup>-1</sup> e pressão de trabalho de 200 Kpa. No momento da aplicação a temperatura era de 26°C e umidade de 85%. O estágio de desenvolvimento das plantas por ocasião da aplicação era de 4-6 folhas.

Avaliações de controle foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT). O método utilizado foi o visual utilizando escala de notas de zero a 100% conforme o nível de injúria ocasionado pelo herbicida às plantas. A nota zero equivale a ausência de injúrias enquanto a nota 100% equivale à morte da planta. Aos 28 DAT a parte aérea das plantas foi coletada e colocada para secar em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72h, quando a massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas foi determinada.

O tipo de herança (dominante ou semidominante) foi determinado de acordo com a análise dos fatores de resistência obtidos com as curvas dose-reposta. A comparação entre os *Xa50* dos parentais e seus respectivos F1 é fundamental na determinação da herança desse caráter.

### **3.4 Citogenética (LE3)**

Assim como na LE2 o material vegetal utilizado para o estudo da citogenética de *E. heterophylla* está descrito anteriormente (item 3.1).

Na LE3 será reportado os procedimentos experimentais utilizados na determinação do número cromossômico somático e do cariótipo; e na análise do comportamento meiótico e na viabilidade de grãos de pólen.

Estes experimentos foram conduzidos no Laboratório de Citogenética da Faculdade de Agronomia da UFRGS, durante os anos de 2010 e 2011.



### 3.4.1 Determinação número cromossômico e descrição cariótipo

A determinação do número cromossômico somático foi efetuada através da contagem de cromossomos em células somáticas de ponta de raiz. A análise destes cromossomos também permitiu realizar a descrição do cariótipo da espécie.

Sementes dos biótipos R e S foram colocadas para germinar após tratamento de desinfecção com hipoclorito de sódio (10%), em placas de petri. Estas foram mantidas em temperatura ambiente até a germinação. Quando as raízes atingiram 0,5 cm de comprimento foi realizada a coleta para a preparação das lâminas (Figura 7).

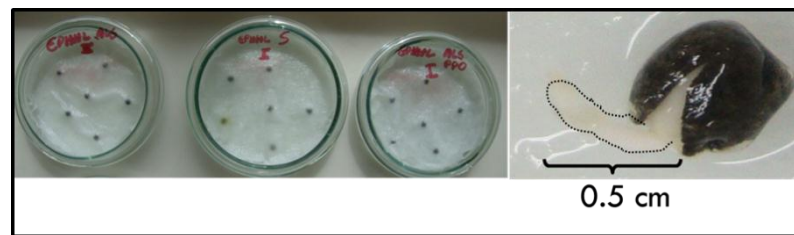


FIGURA 7. Germinação de *E. heterophylla* em placas de petri com papel filtro utilizadas na determinação do número cromossômico somático e na descrição do cariótipo. Porto Alegre-RS, 2010.

Após a coleta das raízes estas foram submetidas ao pré-tratamento com solução de paradiclorobenzeno (PDB) por 18-20h a 4°C, fixadas em solução 3:1 (etanol-ácido acético) por 12-24h e estocadas em álcool 70% em -20°C.

As lâminas foram preparadas com hidrólise das raízes em HCl 1N a 60°C por dez minutos, coradas com Feulgen (24h), pré-tratadas com pectinase (2%), esmagadas em carmim propiônico (2%) e, posteriormente, lâmina e lamínula foram seladas com breu. Foram analisadas cinco plantas de cada biótipo (R ALS/PPO, R ALS e S) e em cada lâmina foram analisadas aproximadamente 50 células com bom espalhamento dos cromossomos.

### 3.4.2 Análise do comportamento meiótico e viabilidade do pólen

Para a análise do comportamento meiótico e viabilidade dos grãos de pólen, foram coletadas flores em diversos estádios de desenvolvimento de plantas já estabelecidas em casa-de-vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS no ano de 2011 (Figura 8).

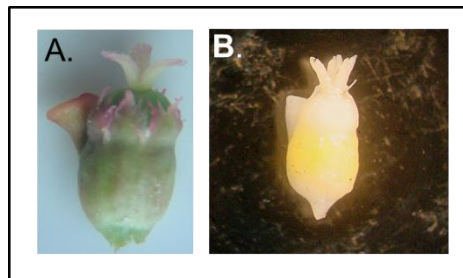


FIGURA 8. Inflorescência de *E. heterophylla* usada na determinação do comportamento meiótico e na análise da viabilidade de grãos de pólen. A) Vista com lupa anterior ao processo de fixação; B) Vista com lupa posterior ao processo de fixação. Porto Alegre-RS, 2011.

As flores foram coletadas e fixadas em solução de álcool e ácido acético na proporção 3:1. O material foi mantido em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente transferido para álcool 70% e armazenado em  $-20^{\circ}\text{C}$  para o preparo das lâminas.

Para as análises, as lâminas foram preparadas com todas as anteras de cada flor, as quais foram separadas, cortadas e maceradas com bastão de vidro, sendo retirado da lâmina o excesso de tecido vegetal, sobre a qual foi adicionada uma gota do corante carmim propiônico (2%). Posteriormente, adicionou-se uma lamínula sobre a lâmina e esta foi pressionada com a extremidade mais larga de uma agulha histológica para obter um bom espalhamento das células. Depois de confeccionadas, as lâminas foram seladas com luto (breu e cera de abelha, na proporção de 3:1), identificadas e observadas em microscópio ou colocadas em caixas e armazenadas em geladeira para avaliação no dia seguinte.

Para o estudo do comportamento meiótico, foram analisadas todas as células meióticas observadas e em todas as fases da meiose I e meiose II. As células que apresentavam todos os cromossomos em associações bivalentes e sem retardatários foram consideradas normais e as que apresentavam cromossomos univalentes, trivalentes, quadrivalentes, associações múltiplas, retardatários e pontes cromossômicas foram consideradas como irregulares.

A análise da viabilidade dos grãos de pólen foi conduzida com botões florais bem desenvolvidos, mas ainda fechados. Para cada biótipo foram analisadas cinco lâminas, contando todos os grãos por lâmina. Os grãos de pólen viáveis foram classificados em diferentes graus de coloração: bem corados (BC), pouco corados (PC) e não corados (NC). Os grãos foram considerados inviáveis quando vazios, sendo a viabilidade estimada em porcentagem.

### **3.5 Estudos moleculares (LE4)**

Na LE4 serão descritos os procedimentos realizados na tentativa de isolar o gene *als* de *E. heterophylla*. Estes experimentos foram conduzidos durante os anos de 2012 e 2013, no Laboratório de Biologia Molecular da University of Arkansas, Arkansas-EUA.

Esta etapa do trabalho foi dividida em três partes de acordo com a evolução no desenho dos *primers* utilizados. Na primeira e segunda tentativa, optou-se pela utilização de DNA como material genômico para as reações de PCR.

Na terceira etapa os *primers* desenhados foram utilizados em reações de PCR que utilizaram RNA ao invés de DNA e uma Taq polimerase inativa a temperaturas ambientes e ativada apenas com a elevação da temperatura (Taq Hotstart-Invitrogen).

### 3.5.1 Extração do material genômico

O material vegetal utilizado na extração do DNA foi aproximadamente 150 mg de tecido foliar jovem dos biótipos S, R ALS e R ALS/PPO. Imediatamente após a coleta, o material foi macerado em N<sub>2</sub> líquido. A extração de DNA foi realizada conforme protocolo adaptado de Murray e Thompson (1980). A concentração em nanogramas por microlitro (ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) das amostras de DNA foram obtidas pela quantificação em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para a extração de RNA o mesmo material vegetal foi utilizado, porém para a coleta foi necessário limpar todos os instrumentos bem como a superfície de trabalho com álcool 70% e *RNaseZap* (Spyglass). Imediatamente após a coleta o material foi congelado em N<sub>2</sub> líquido. Previamente a realização do protocolo para a extração de RNA foram realizados os procedimentos de descontaminação de RNases do material com água DEPC (dietilpirocarbonato) e autoclavagem. Estes procedimentos foram realizados de forma a diminuir a contaminação com RNases das soluções, equipamentos, vidrarias e reagentes. O RNA foi extraído utilizando o *PureLink<sup>®</sup> RNA Mini Kit* (Ambion by Life Thecnologies).

Imediatamente após a extração o RNA foi limpo e concentrado utilizando o *kit RNA Clean & Concentrator<sup>™</sup>* (Zymo Research). Em seguida foi realizada a síntese de cDNA utilizando o *kit GoScript Reverse Transcription System* (Promega). Após a síntese o cDNA foi quantificado em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.5.2 Desenho dos primers

O gene *als* é composto por cinco domínios altamente conservados onde foram identificadas as mutações responsáveis pela resistência aos herbicidas (HAN *et al.*, 2012). A primeira região do gene (sentido 5' → 3') é denominada CAD (região 1), seguida pela região intermediária F (região 2) e na região terminal do

gene localizam-se os domínios B e E (região 3) (TRANEL *et al.*, 2011). Os *primers* foram desenhados de forma a amplificarem todos os domínios do gene. Assim, *primers* sobrepostos foram desenhados utilizando as ferramentas *Sequencher* (versão 4.8) e o programa *Oligo Analyzer 3.1* (IDT, Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com>). Todos os *primers* utilizados neste trabalho foram sintetizados pela IDT.

A espécie *E. heterophylla* não possui seu genoma sequenciado e não há dados na literatura e nem em bancos de dados genéticos a respeito do seu genoma. Por este motivo, abordagens utilizando diferentes espécies foram utilizadas no desenho dos *primers* para tentar isolar o gene *als* nesta espécie. Em todas as etapas as sequências nucleotídicas do gene *als* foram alinhadas utilizando o programa *Sequencher* (versão 4.8) ou pelo programa ClustalW (EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Na primeira etapa os *primers* foram desenhados com base em sequências do gene *als* de 10 diferentes espécies dicotiledôneas. As seguintes espécies e respectivos números de acesso no GenBank (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram utilizadas no alinhamento: *Arabidopsis thaliana* (AY042819), *Amaranthus powelli* (AF363370), *Amaranthus retroflexus* (AF363369), *Amaranthus tuberculatus* (EF157820), *Bassia scoparia* (EU517465), *Medicago trunculata* (XM003602758), *Glycine max* (FJ581423), *Brassica napus* (M600668), *Salsola tragus* (GU271180) e *Bidens pilosa* (AJ514934). Estas espécies representam diversas famílias de plantas onde o gene ALS foi sequenciado. Foram selecionados um total de 9 *primers* (Tabela 3).

TABELA 3. Sequências nucleotídicas dos *primers* regulares e degenerados utilizados para isolar astrês regiões conservadas do gene *als* em *E. heterophylla*. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Tm (°C)	GC (%)	Fragmento (pb)	Região
1 FW ALS	AAACCTAAACCTCCGCTCCG	60,04	55	747	CAD e F
1 RV ALS	ACTTCAAGCAACCACCACCA	60,03	50		
3 FW ALS	ATCCTGATGCGGTTGTTGGT	59,96	50	395	BE
3 RV ALS	ACGATCACATCAAGCAGCCA	60,04	50		
5 FW ALS	GAAAGCCCCCAACCCCATTA	59,96	55	556	CAD
5 RV ALS	CTACTGGACGCGTTGGAGTT	60,04	55		
7 FW ALS	TACAAACTCCAACGCGTCCA	59,90	50	732	CAD e F
7 RV ALS	GCAAGACCGGATGACGAGAT	59,90	55		
2 FW ALS	TGGTGGTGGTTGCTTGAAGT	60,03	50	890	BE e F
8 RV ALS	AGCTATCTGCGAACCGCATT	60,18	50		
1 deg FW ALS	MWACSTVMABCKCYKCTYCK				
1 deg RV ALS	AVYTCMADYAWCCABCACMR				
3 deg FW ALS	VBVYYGRWGCDRWBWGTYGSK				
3 deg RV ALS	ACRATYABWKSMDSDVDVYA				
7 FW ALS	TACAAACTCCAACGCGTCCA				Mesmas características dos respectivos primer regulares acima.
7 deg RV ALS	GCDARDCCVGMTRWSDAVRW				
2 deg FW ALS	YKGTGVTGGWTRHTKGARBT				
8 deg RV ALS	RGVTANSWRYRWRYHBBRWK				

Tm: Temperatura de anelamento; GC: Conteúdo de guanina e citosina em porcentagem; pb: Pares de bases.

Os *primers* utilizados na primeira etapa foram desenhados de forma sobreposta com vistas a amplificar todas as regiões do gene *als* (Figura 9).

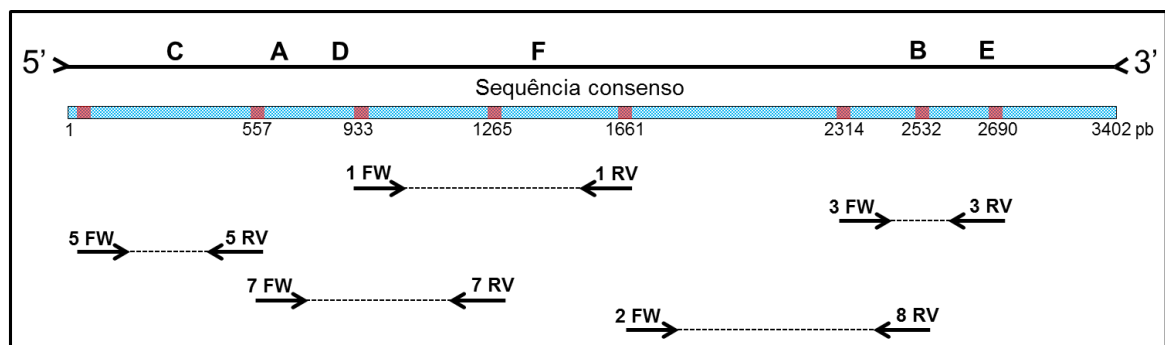


FIGURA 9. Representação esquemática do gene *als* e *primers* utilizados para a sua amplificação. Os *primers* estão descritos na Tabela 3. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.

Na segunda etapa os *primers* foram desenhados com base na sequências do gene *als* de *Arabidopsis thaliana* (AY042819) e de duas espécies pertencentes a família euphorbiaceae *Ricinus communis* (XM002529773) e *Manihot esculenta* (JGI, Joint Genome Institute, <http://www.phytozome.net>). Nesta etapa o alinhamento, em ClustalW, foi realizado com a sequência de aminoácidos ao invés da nucleotídica. Deste modo foi possível encontrar regiões do gene com maior similaridade. Em seguida as sequências destas regiões foram traduzidas

em bases para a geração da sequência consenso para ser então utilizada no programa *Oligo Analyzer 3.1* no desenho dos *primers* (Tabela 4).

TABELA 4. Sequências nucleotídicas dos *primers* regulares desenhados a partir de espécies da família *euphorbiaceae* utilizados para isolar as três regiões conservadas do gene *als* em *E. heterophylla*. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	GC (%)	Fragmento (pb)	Região
CAD ALS FW	GAATTCTGAGCCACGCGTTC	59,90	55	575	CAD e F
CAD ALS RV	TCTGCCAAGCCACTTACGAG	60,04	55		
F ALS FW	CATGAGCAAGGTGGGGTCTT	59,96	55	717	F
F ALS RV	CTTGCCTGTCAACCCTGTCAT	59,96	55		
BE ALS FW	ATGACAGGGTGACAGGCAAG	59,96	55	414	BE e F
BE ALS RV	TAGCCCCTAATCCCCCTGAC	60,10	60		

T<sub>m</sub>: Temperatura de anelamento;  
GC: Conteúdo de guanina e citosina em porcentagem;  
pb: Pares de bases.

Os *primers* da segunda etapa também foram desenhados de forma sobreposta com vistas a amplificar todas as regiões do gene *als* (Figura 10).

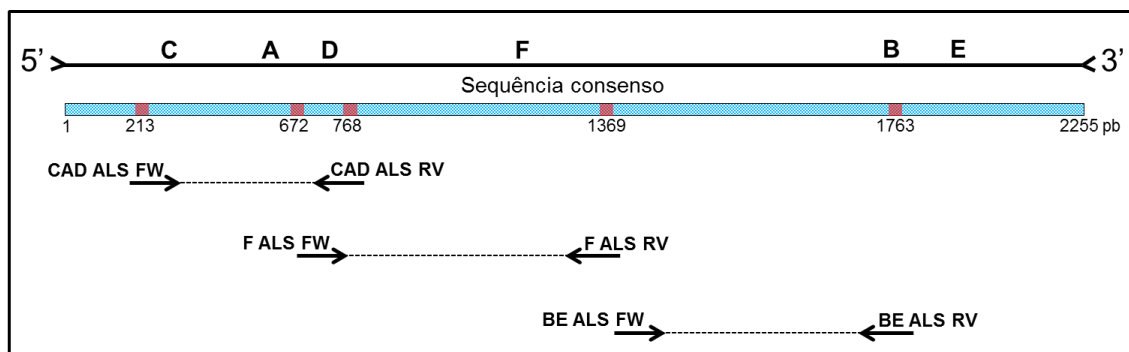


FIGURA 10. Representação esquemática do gene *als* e *primers* utilizados na segunda etapa para a sua amplificação. Os *primers* estão descritos na Tabela 4. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.

Nas etapas 1 e 2 as reações de PCR (reação da polimerase em cadeia) foram conduzidas em um volume final de 15 µL de reação composta da mistura de 0,5 X de PCR *Taq buffer* (Promega), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (200 µM), cada *primer forward* e *reverse* (0,6 µM), 1 U de *Taq DNA* polimerase (Promega), 50 ng de DNA genômico e água miliQ para completar o volume final. A amplificação foi

realizada em termociclador MJ *Research*-PTC100 utilizando o seguinte ciclo: 3 min a 94°C para a desnaturação inicial do DNA, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min para o anelamento dos *primers* e 1,5 min a 72°C de alongação da fita de DNA. Finalizando a amplificação as amostras foram submetidas por mais 10 min de alongação final a 72°C.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo (10 mg mL<sup>-1</sup>) usando *ladder* de 50 ou 1000 pb (Promega) como referência e em seguida fotografados com auxílio do programa KODAK DIGITAL SCIENCE 1D. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e encaminhados para o sequenciamento no DNA Resource Center of the University of Arkansas, EUA, utilizando o sequenciador ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Na terceira etapa os *primers* foram desenhados com base nas sequências de aminoácidos da mesma forma como descrito na abordagem utilizada na segunda etapa. Entretanto foram utilizadas espécies diferentes das citadas anteriormente. As sequências do gene *als* foram: *Gossypium hirsutum* (Z46960), *Ricinus communis* (XM002529773), *Amaranthus tuberculatus* (EF157819), *Helianthus anus* (AY541455), *Conyza canadensis* (HM067014) e *Bidens subalternans* (EU622538). As sequências foram alinhadas com o auxílio do *ClustalW* e os *primers* foram desenhados manualmente de acordo com as regiões conservadas observadas no alinhamento. A ocorrência de dímeros, formação de *hairpin* e hetero-dímeros foi verificada pelo programa *Oligo Analyzer* (versão 3.1). Os *primers* desenhados na terceira etapa (Tabela 5) amplificam apenas as regiões 1 e 2 do gene (Figura 11).



TABELA 5. Sequências nucleotídicas de um *primer* regular e dois degenerados utilizados para isolar as regiões CAD e F do gene *als* em *E. heterophylla*. Fayetteville-AR, 2013.

Primers	Sequência (5'→3')	Tm (°C)	GC (%)	Fragmento (pb)	Região
ALS 1FW	HATGGAGATYCACCARGC	52,2	52	758	CAD e F
ALS 1RV	TCATCAAAYCKNACMCCAAA	52	40		
ALS 2FW	CCDGTTTTNTATGTNGGDGGTGG	57	51	223	CAD
ALS 2RV	TCATCAAAYCKNACMCCAAANGC	57	46		
ALS 3FW	TCCTTGGAGATCCACCAAGCTC	59	55	169	CAD
ALS 3RV	AACCGCTGACGAGATTGGTGGC	62	59		

Tm: Temperatura de anelamento;

GC: Conteúdo de guanina e citosina em porcentagem;

pb: Pares de bases.

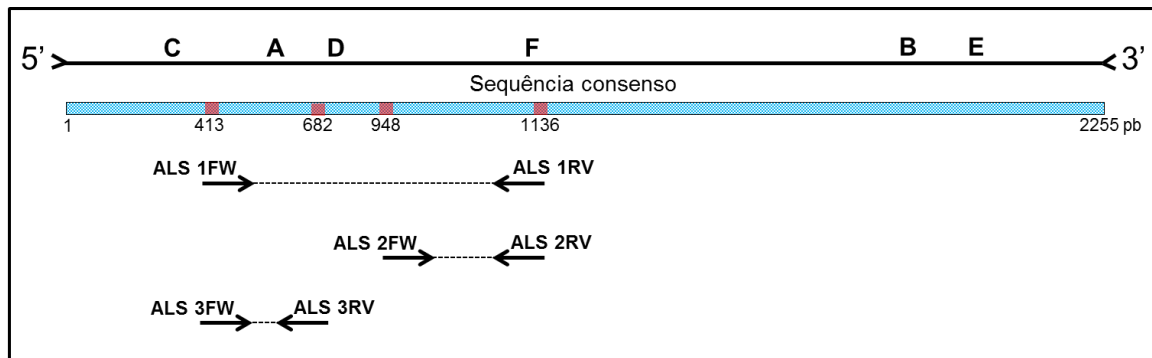


FIGURA 11. Representação esquemática do gene ALS e *primers* utilizados na terceira etapa para a sua amplificação. Os *primers* estão descritos na Tabela 4. Fayetteville-AR, 2012 e 2013.

Na terceira etapa a enzima *Taq polimerase HotStart* (Qiagen) foi utilizada para a amplificação das regiões do gene ALS. As reações foram conduzidas em um volume final de 25  $\mu$ L da mistura de 1 X PCR *Taq buffer*, Q-solution 1 X, MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM), dNTPs (200  $\mu$ M), cada *primer forward* e *reverse* (0,5  $\mu$ M), 2,5 U de *Taq Hotstart* (Invitrogen), 50 ng de DNA genômico e água miliQ para completar o volume final. A amplificação foi realizada em termociclador MJ *Research-PTC100* utilizando o seguinte ciclo: 15 min de incubação a 95°C, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, 63°C por 1 min para o anelamento dos *primers* e 1,5 min a 72°C de alongação da fita de DNA. Finalizando a amplificação as amostras foram submetidas por mais 10 min de alongação final a 72°C. A

visualização dos produtos amplificados bem a purificação e sequenciamento foi realizada da mesma forma como descrito anteriormente para as etapas 1 e 2.

### **3.6 Germinabilidade em *E. heterophylla* (LE5)**

As sementes dos biótipos R ALS, R ALS/PPO e as sementes dos biótipo S possuem a mesma origem descrita no item 3.1. É importante destacar que as sementes foram armazenadas em geladeira. A confirmação dos biótipos com resistência aos inibidores da ALS e dos biótipos com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX foi documentada, respectivamente, por Trezzi *et al.* (2005) e Trezzi *et al.* (2006). As sementes utilizadas apresentaram duas idades distintas: sementes com 2 meses de idade e sementes com 12 meses de idade.

Os experimentos de germinação foram conduzidos durante os anos de 2010 e 2011 no laboratório de biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Cada ano constituiu uma replicata de cada experimento, totalizando desta forma duas replicatas experimentais. Placas de petri com 6 cm de diâmetro foram utilizadas e dispostas em câmaras de crescimento sob temperatura e luminosidade controladas. As temperaturas analisadas foram: 16, 20, 26 e 32°C; e as condições de luminosidade foram 12 horas de fotoperíodo. Em cada placa de petri foram acondicionadas 25 sementes de cada biótipo (S, R ALS e R ALS/PPO) (Figura 12). Cada placa de petri constituiu uma unidade experimental. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições totalizando 12 unidades experimentais por idade de sementes e por temperatura.



FIGURA 12. Preparação das unidades experimentais para a análise da germinação de sementes de *E. heterophylla* resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. Porto Alegre-RS, 2010.

As avaliações ocorreram todos os dias durante as duas semanas de incubação. Avaliou-se o número de sementes germinadas por placa de petri. Consideravam-se germinadas sementes que apresentavam o coleóptilo com mais de 3 mm de comprimento (Figura 13).



FIGURA 13. Estádio de desenvolvimento da semente considerado na contagem de sementes germinadas. Porto Alegre-RS, 2010.

Os resultados foram analisados quanto à homocedasticidade, e, posteriormente, submetidos à ANOVA adotando-se como limites de aceitação de significância o nível de 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ), tanto para efeitos individuais dos fatores quanto para a interação. A ANOVA foi realizada através do programa SAS (SAS, 1989). Quando houve significância para o teste F, os dados

foram ajustados ao modelo logístico de três parâmetros (SEEFELDT *et al.*, 1995), utilizando-se a equação:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^b} \quad \text{Equação 2.}$$

onde, Y = germinação acumulada (%); Y<sub>0</sub> = mínimo (Y) germinação obtido; a = máximo (Y) germinação obtido; X = datas de avaliação; X<sub>0</sub> = data correspondente a 50% de germinação; b = parâmetro do modelo que descreve a declividade da curva.

O tempo médio de germinação em dias (MLIT) foi determinado de acordo com Czabator (1962) apud Ranal & Santana (2006):

$$MLIT = \frac{(G_1T_1 + \dots + G_nT_n)}{(G_1 + \dots + G_n)} \quad \text{Equação 3.}$$

onde, G<sub>1</sub>= número de sementes germinadas no dia 1 e T<sub>1</sub>= tempo em dias. A taxa de germinação (TG) foi calculada de acordo com Maguire (1962) apud Ranal & Santana (2006):

$$TG = \left( \frac{G_1}{T_1} + \dots + \frac{G_n}{T_n} \right) \quad \text{Equação 4.}$$

e o coeficiente de velocidade de germinação (CVG) em percentagem foi determinado de acordo com Kotowski (1926) apud Ranal & Santana (2006):

$$CVG = \frac{100}{MLTI} \quad \text{Equação 5.}$$

As variáveis MLIT, TG e CVG foram determinados para os biótipos S, R ALS e R ALS/PPO em cada temperatura analisada e nas diferentes idades de sementes.

### **3.7 Resistência tríplice em *E. heterophylla* (LE6)**

A verificação da ocorrência de resistência tríplice nos biótipos resistente a ALS e com resistência múltipla foi determinada por meio de experimentos de curvas de dose-resposta sob o crescimento de plantas e via ensaios de absorção e translocação utilizando o herbicida radiomarcado. O material vegetal utilizado nesses experimentos foi o mesmo descrito anteriormente (item 3.1).

#### **3.7.1 Curva de dose-resposta ao glifosato**

Experimentos foram conduzidos durante o ano de 2011, em casa de vegetação localizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. As sementes foram semeadas em vasos, com uma capacidade de volume de 300 ml, cobertos com uma mistura de solo e areia na proporção 3:1. Após a emergência das plantas, apenas uma única planta foi mantida por vaso. As condições de crescimento foram de 38/21°C (dia/noite) de temperatura. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água para manter o solo constantemente irrigada.

Os tratamentos foram arranjos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, fatorial com quatro repetições. Ao fator A foi atribuído os biótipos (S, R ALS, R ALS/PPO), ao fator B as doses de glifosato (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1200 g e.a. ha<sup>-1</sup>). A aplicação dos herbicidas foi realizada com pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub>, a 200 kPa, e equipado com bico 110,02, simulando vazão de 200 L ha<sup>-1</sup> de calda. Durante a aplicação, a

temperatura do ar era de 26°C e a humidade relativa do ar era de 85%. O estágio de desenvolvimento das plantas no tempo de aplicação foi de quatro a seis folhas desenvolvidas.

O efeito do herbicida foi avaliado aos 28 dias após o tratamento (DAT) onde avaliou-se o controle de plantas daninhas, utilizando-se uma escala visual de zero a 100% (zero representava nenhuma injúria visual enquanto que 100% equivale a morte da planta), e massa seca da parte aérea (após secagem em ventilação forçada a 60°C durante 72 h).

### **3.7.2 Absorção e translocação de <sup>14</sup>C-glifosato**

Biótipos resistentes e suscetível foram semeados em vasos com capacidade volumétrica de 500 mL preenchidos com mistura comercial de substrato (“*Sunshine mix*”) e mantidos em casa-de-vegetação localizada na University of Arkansas, EUA, durante o ano de 2013. Uma planta foi mantida por vaso.

As condições de crescimento foram médias entre 28/17°C de temperatura do ar e 63% de umidade relativa. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água para manter o solo constantemente irrigado por capilaridade e mantidos em casa de vegetação até atingirem o estágio de aplicação do herbicida glifosato (5-6 folhas).

O experimento foi conduzido em delineamento experimental completamente casualizado com quatro tratamentos: 4, 8, 48 e 72 HAT (horas após a aplicação do herbicida radiomarcado); e três biótipos: S, R ALS e R ALS/PPO, totalizando desta forma 12 tratamentos com 4 repetições por biótipo (48 unidades experimentais) (Tabela 6).

TABELA 6. Tratamentos utilizados para a análise de absorção e translocação do herbicida  $^{14}\text{C}$ -glifosato em biótipos de *E. heterophylla*. Fayetteville-AR, 2013.

Tratamentos	Biótipos	HAT*
1	S	4
2	S	8
3	S	24
4	S	72
5	R ALS	4
6	R ALS	8
7	R ALS	24
8	R ALS	72
9	R ALS/PPO	4
10	R ALS/PPO	8
11	R ALS/PPO	24
12	R ALS/PPO	72

\*HAT: Horas após o tratamento.

No momento da aplicação do herbicida glifosato uma folha individual completamente expandida de *E. heterophylla* foi marcada com caneta *sharpie* e coberta com papel alumínio. Imediatamente após a marcação o herbicida não-radiomarcado glifosato (formulação comercial Roundup Power) foi aplicado na dose equivalente a  $870 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ . O herbicida foi aplicado em câmara de aspersão equipada com três bicos do tipo leque 110.02, com volume de calda correspondente a  $187,8 \text{ L ha}^{-1}$  (20 GPA). Uma alíquota de 5 mL da calda de aplicação foi mantida para o preparo da solução de trabalho radiomarcada.

A solução de trabalho foi preparada contendo  $443,7 \mu\text{L}$  da solução de aplicação (alíquota retirada da calda de aplicação) e  $56,3 \mu\text{L}$  da solução estoque contendo o herbicida radiomarcado ( $^{14}\text{C}$ -glifosato). A atividade específica do herbicida radiomarcado  $^{14}\text{C}$ -glifosato é de  $50 \text{ mCi mmol}^{-1}$  ( $=1,85 \text{ GBq mmol}^{-1}$ ) sendo este utilizado para o preparo da solução estoque onde foi utilizado água estéril como solvente. Portanto, a concentração da solução estoque é de  $0,1 \mu\text{Ci } \mu\text{L}^{-1}$  enquanto a concentração da solução de trabalho é de  $25.000 \text{ DPM } \mu\text{L}^{-1}$  ou  $0,0112 \mu\text{Ci } \mu\text{L}^{-1}$  ( $1 \mu\text{Ci} = 2.220.000 \text{ DPM}$ ).

Imediatamente após a aplicação do herbicida comercial as plantas foram levadas para o laboratório e com o auxílio de uma microseringa de  $50 \mu\text{L}$

(Hamilton) quatro gotas (1  $\mu$ L) da solução de trabalho contendo  $^{14}\text{C}$ -glifosato foram aplicadas nas folhas marcadas que estavam inicialmente cobertas com papel alumínio. As plantas foram coletadas 4, 8, 48 e 72 HAT cortando a planta na superfície do solo e seccionando em quatro partes: folha tratada (FT), folhas não-tratadas (NT), parte aérea (PA) e raízes (R).

Para remover o herbicida radiomarcado não absorvido a folha tratada foi colocada dentro de um *vial* de plástico contendo 5 mL da solução metanol:água (1:1 v/v) e lavadas por meio de agitação manual durante 30 s. Após a folha foi retirada do vial e colocada em envelope. A esta solução foi adicionado 10 mL do coquetel de cintilação (Ultima Gold, PerkinElmer) e em seguida procedeu-se com a leitura em espectroscopia de cintilação líquida - LSS (*Liquid scintillation spectroscopy*).

Para a determinação da translocação do  $^{14}\text{C}$ -glifosato as demais partes seccionadas da planta juntamente com as folhas tratadas foram acondicionadas individualmente em envelopes de papel e secas em estufa de ventilação forçada a  $60^{\circ}\text{C}$  por 72 h. Após a secagem as partes das plantas foram oxidadas utilizando o oxidador biológico OX500 (R.J. Harvey Instrument Corporation) onde o  $\text{CO}_2$  produzido foi capturado em 15 mL do coquetel de cintilação sendo a radioatividade obtida pelo LSS.

A absorção foi expressa em relação a porcentagem de  $^{14}\text{C}$ -glifosato aplicado inicialmente enquanto a translocação foi expressa de acordo com a porcentagem de radioatividade recuperada nas plantas. A análise de variância (ANOVA) foi realizada através do teste F, adotando-se como limites de aceitação de significância o nível de 5% de probabilidade, tanto para efeitos individuais dos fatores quanto para a interação. A ANOVA foi realizada através do programa SAS (SAS, 1989). As médias dos tratamentos entre os diferentes biótipos foram



comparadas aplicando-se o teste da diferença mínima significativa (DMS) enquanto as médias dos tratamentos de um mesmo biótipo foram comparadas pelo desvio padrão da amostra (SE com  $n=4$ ).

## 4 RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nas LE desenvolvidas pelo presente trabalho. Semelhantemente ao apresentado no capítulo anterior, este capítulo também será dividido de acordo com as LE. Essa divisão em tópicos particulares visa facilitar o entendimento do leitor.

### 4.1 Resistência cruzada aos inibidores da ALS (LE1)

Os experimentos desenvolvidos na LE1 buscaram a confirmação da resistência assim como a verificação da ocorrência de resistência cruzada nos biótipos S, R ALS e R ALS/PPO. Para isso, foram realizados experimentos de curvas de dose-resposta sob o crescimento de plantas e ensaios enzimáticos *in vivo*. Este tópico inicia apresentando os resultados obtidos com as curvas de dose-resposta e, posteriormente, os resultados obtidos com a atividade enzimática *in vivo* da enzima ALS.

#### 4.1.1 Curvas de dose-resposta sobre o crescimento de plantas

A análise dos dados através do teste F demonstrou interação significativa entre herbicida x dose por biótipo ( $p \leq 0,05$ ). Assim, os dados de controle foram ajustados a equação log-logística de três parâmetros (Tabela 7). Por meio da análise visual de controle a resistência cruzada em ambos biótipos resistentes testados foi confirmada nos cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS (IMI, SU, PTB, TP e SCT) (Tabela 7). A exceção ocorreu no herbicida

flucarbazone em que nenhuma das doses testadas foram observados injúrias no biótipo com resistência múltipla e por este motivo os dados não se ajustaram a equação logística de três parâmetros (Tabela 7). Deste modo, o fator de resistência (FR) para este herbicida só pode ser atribuído para o biótipo R ALS (Tabela 7).

TABELA 7. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de controle (C<sub>50</sub>) de biótipos de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013.

Biótipos	Herbicidas	Parâmetros da regressão <sup>1</sup>					FR
		a	b	Xa <sub>50</sub>	C <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	
S	imazethapyr	96,9(3,6) <sup>2***3</sup>	1,4(0,2)**	10,6(1,1)***	11	0,99***	-
R ALS		98,4(5,6)***	0,8(0,1)**	614,4(152)**	614	0,98***	56
R ALS/PPO		93,9(5,6)***	1,2(0,3)**	643,5(144)**	644	0,98***	59
S	nicosulfuron	98,7(3,1)***	1,1(0,1)***	4,5(0,4)***	5	0,99***	-
R ALS		94,1(6,2)***	1,9(0,5)*	257(29,3)***	257	0,97**	51
R ALS/PPO		100,9(2,2)***	1,1(0,1)***	409(29,9)***	409	0,99***	82
S	bispiribaque-sódico	98,2(5,1)***	0,9(0,1)**	4,5(0,8)***	5	0,99***	-
R ALS		98,4(1,5)***	2,0(0,4)**	491,3(53)***	491	0,98***	98
R ALS/PPO		98,9(1,4)***	3,0(0,9)*	486,6(74)**	487	0,97**	97
S	cloransulam-metil	99,5(4,5)***	0,4(0,1)**	11,8(3,6)*	12	0,98***	-
R ALS		99,7(1,6)***	0,6(0,1)*	3376(2378) <sup>ns</sup>	3376	0,97**	281
R ALS/PPO		99,9(0,5)***	1,1(0,3)*	2851(1695) <sup>ns</sup>	2851	0,97**	238
S	flucarbazone-sódico	102,8(3,9)***	0,9(0,08)***	12,7(7,2)***	13	0,99***	-
R ALS		100,6(11,8)***	0,4(0,2)**	175,6(140)*	176	0,86**	14
R ALS/PPO				ND <sup>4</sup>			

<sup>1</sup>Equação logística de 3 parâmetros  $f = a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b)$ ;

<sup>2</sup>Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média;

<sup>3</sup>Significância pelo teste 't' ao nível de: \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=ausência de significância;

<sup>4</sup>Não determinado devido ao não ajuste a equação logística. Ajuste apenas a equação linear.

De maneira geral, foram identificados elevados valores de FR para todos os herbicidas testados (Tabela 7). O maior FR determinado foi 281 e 238 para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente, com o herbicida cloransulam-metil. Os valores de C<sub>50</sub> para este herbicida superaram a maior dose testada de 240 g ha<sup>-1</sup> equivalente a 6X a dose de rótulo (40 g ha<sup>-1</sup>) (Tabela 7).

Para os herbicidas nicosulfuron e bispiribaque também foi possível determinar valores de C<sub>50</sub> superiores a maior dose testada (6X a dose recomendada). Já para o herbicida imazethapyr os valores de C<sub>50</sub> equivalentes a 614 e 644 g ha<sup>-1</sup> para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente, foram

inferiores a maior dose testada ( $4000 \text{ g ha}^{-1}$ ). Entretanto, mesmo sendo inferiores a maior dose testada ainda assim configuram FR elevados pois equivalem a mais de 6x a dose recomendada (Tabela 7).

Para os resultados de controle as curvas de resposta às doses sobre o crescimento de planta indicam que para ambos os biótipos o nível de sobrevivência diminuiu com o incremento da dose (Figura 14). Porém nos biótipos R a sobrevivência reduziu em menor magnitude e de forma mais gradual do que no biótipo S. As doses necessárias para controlar 50% do biótipo S foram 11, 5, 5, 12 e 13  $\text{g ha}^{-1}$  para os herbicidas imazethapyr, nicosulfuron, bispiribaque, cloransulam e flucarbazone, respectivamente (Tabela 7). Essas doses são muito baixas e equivalem a 0,1X; 0,08X; 0,1X; 0,3X e 0,4X da dose recomendada dos herbicidas imazethapyr, nicosulfuron, bispiribaque, cloransulam e flucarbazone, respectivamente.

De acordo com os dados de controle o biótipo S foi controlado 100% com a dose de rótulo do herbicida imazethapyr ( $100 \text{ g ha}^{-1}$ ), enquanto os biótipos R ALS e R ALS/PPO foram controlados 27 e 20%, respectivamente (Figura 14A). O controle superior a 80% dos biótipos R para este herbicida foi obtido na dose equivalente a 40X a dose de rótulo (Figura 14A). Para o herbicida nicosulfuron a dose de rótulo ( $60 \text{ g ha}^{-1}$ ) resultou em 99% de controle do biótipo S, enquanto na mesma dose o controle obtido para os biótipos R ALS e R ALS/PPO foi de 20 e 7%, respectivamente (Figura 14B). A dose de rótulo ( $50 \text{ g ha}^{-1}$ ) do herbicida bispiribaque resultou em 92% de controle do biótipo S, enquanto na mesma dose o controle obtido para os biótipos R ALS e R ALS/PPO foi de 5 e 3%, respectivamente (Figura 14C). O biótipo S foi 69% controlado pela dose de rótulo do herbicida cloransulam ( $40 \text{ g ha}^{-1}$ ) enquanto na mesma dose para os biótipos resistentes o controle foi menor que 10% (Figura 14D).

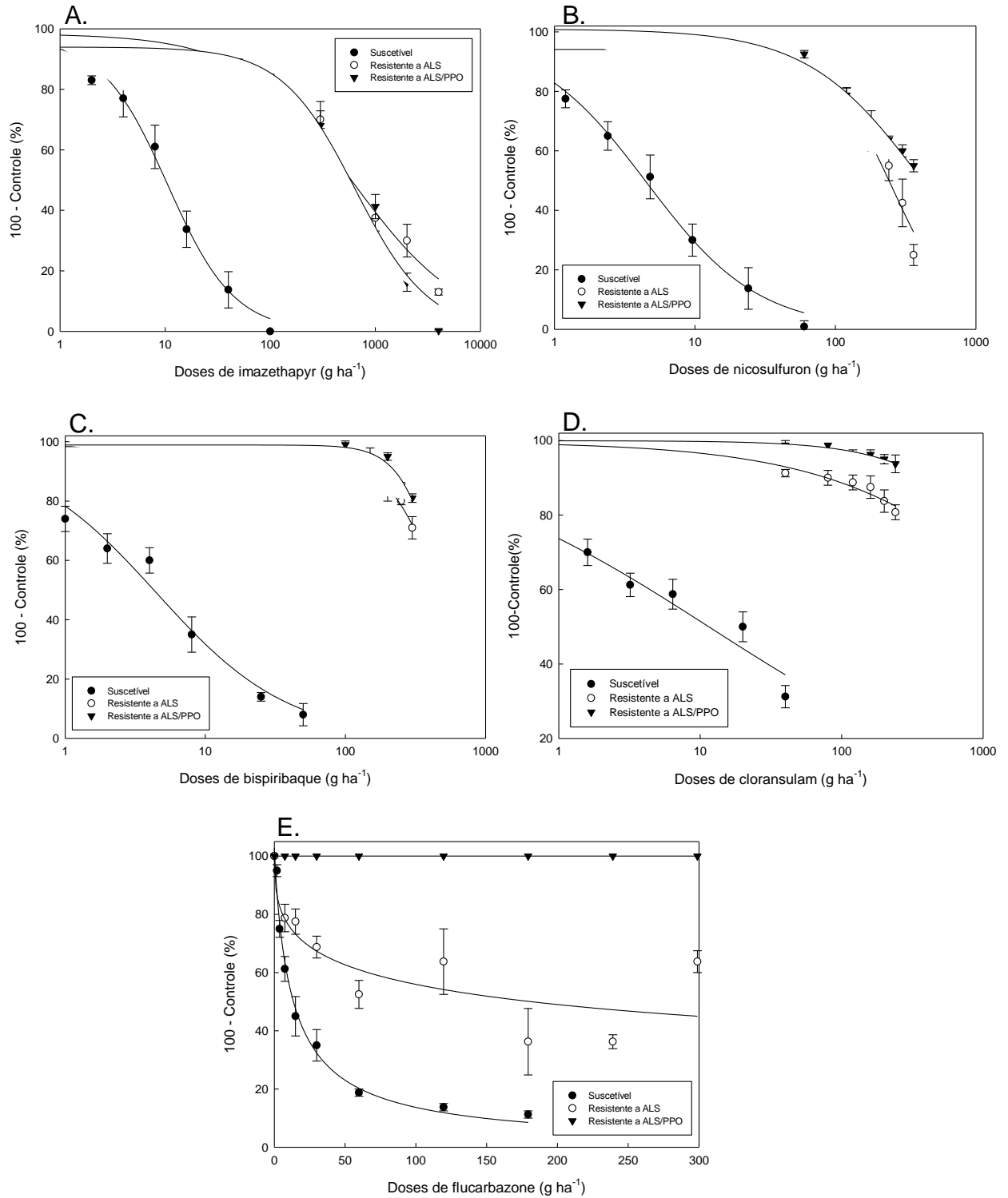


FIGURA 14. Efeito dos herbicidas pertencentes aos cinco grupos químicos dos inibidores da ALS (A. imazethapyr; B. nicosulfuron; C. bispyribac; D. cloransulam; e E. flucarbazone) no controle (porcentagem injúria visual estimada) em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e resistente. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias  $\pm$  SE (n=4).

Para o herbicida flucarbazone o controle obtido no biótipo S com a dose de rótulo ( $30 \text{ g ha}^{-1}$ ) foi de 65% e nesta mesma dose 31% de controle foi observado no biótipo R ALS. Em contrapartida, o biótipo com resistência múltipla não foi controlado nem na maior dose testada de  $300 \text{ g ha}^{-1}$  (10X a dose de rótulo) deste herbicida (Figura 14E).

Para a variável MSPA as curvas de dose-resposta indicam redução de massa seca em todos os biótipos a medida em que se aumentam as doses (Figura 15). Todavia, a redução de massa seca do biótipo S ocorreu em maior magnitude quando comparado aos biótipos resistentes. Os FR observados foram elevados para todos os herbicidas (Tabela 8).

TABELA 8. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de redução da massa seca da parte aérea ( $GR_{50}$ ) de biótipos de *E.heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013.

Biótipos	Herbicidas	Parâmetros da regressão <sup>1</sup>					FR
		a	b	$Xa_{50}$	$GR_{50}$	$R^2$	
S	imazethapyr	100,1(3,6) <sup>2***3</sup>	0,9(0,1)**	1,2(0,3)*	1	0,99***	-
R ALS		99,9(7,3)***	0,6(0,1)**	225,5(84,9)*	226	0,98**	226
R ALS/PPO		97,7(5,3)***	0,8(0,1)**	290,9(65,9)*	291	0,98***	291
S	nicosulfuron	99,6(4,7)***	0,5(0,1)**	5,4(1,5)*	5	0,98***	-
R ALS		96,3(4,7)***	2,3(0,4)**	228,8(17,2)***	229	0,98***	46
R ALS/PPO		99,4(3,0)***	1,5(0,2)**	284,4(17,7)***	284	0,99***	57
S	bispiribaque-sódico	100,1(2,2)***	0,7(0,1)***	0,5(0,1)**	1	0,99***	-
R ALS		100,0(1,3)***	1,9(0,1)***	235,9(5,2)***	236	0,99***	236
R ALS/PPO		101,4(1,4)***	1,9(0,1)***	273,1(6,9)***	273	0,99**	273
S	cloransulam-metil	100,1(3,5)***	0,2(0,04)*	13,5(7,2) <sup>ns</sup>	14	0,98***	-
R ALS		99,7(0,8)***	0,9(0,04)***	484,9(28,7)***	485	0,99***	37
R ALS/PPO		98,4(2,6)***	1,4(0,3)*	435,4(75,4)**	435	0,97**	31
S	flucarbazone-sódico	104,8(24,2)**	0,5(0,1)*	18,6(19,4)	19	0,99***	-
R ALS		96,8(5,5)***	0,7(0,1)**	108,7(24,5)**	109	0,98***	6
R ALS/PPO		100,4(3,6)***	0,3(0,01)*	7868(8842)*	7868	0,95**	414

<sup>1</sup>Equação logística de 3 parâmetros  $f = a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b)$ ;

<sup>2</sup>Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média;

<sup>3</sup>Significância pelo teste 't' ao nível de: \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=ausência de significância.

Elevado nível de resistência foi observado para os herbicidas imazethapyr e bispiribaque (Tabela 8). Nestes herbicidas foram determinados os maiores FR. Em relação aos valores de  $GR_{50}$ , para imazethapyr e bispiribaque foram superiores a 2X e 4X respectivamente, a dose recomendada destes herbicidas

(Tabela 8). Para o herbicida imazethapyr, os valores de  $GR_{50}$  dos biótipos R ALS e R ALS/PPO, equivalem a 226 e 291  $g\ ha^{-1}$ , respectivamente, enquanto para o herbicida bispiribaque os valores de  $GR_{50}$  foram 236 e 273, respectivamente (Tabela 8). Destaque deve ser feito para o herbicida flucarbazone devido ao elevado fator de resistência (423) encontrado para o biótipo R ALS/PPO (Tabela 8). Este resultado justifica-se pela ausência de controle observada pelo tratamento com este herbicida.

De acordo com os dados de MSPA para o biótipo S a dose recomendada do herbicida imazethapyr ( $100\ g\ ha^{-1}$ ) resultou em zero de massa seca (100% de controle) enquanto para os biótipos R ALS e R ALS/PPO a produção de massa nesta dose foi de 52 e 70%, respectivamente (Figura 15A). Para o herbicida nicosulfuron a dose de rótulo ( $60\ g\ ha^{-1}$ ) resultou em 19% de MSPA para o biótipo S, enquanto na mesma dose a MSPA obtida para os biótipos R ALS e R ALS/PPO foi de 89 e 90%, respectivamente (Figura 15B). A dose de  $300\ g\ ha^{-1}$  que equivalente a 6X a dose de rótulo do herbicida bispiribaque resultou em 40 e 47% de MSPA para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Figura 15C). Para o herbicida cloransulam a dose de rótulo ( $40\ g\ ha^{-1}$ ) resultou em 45% de MSPA para o biótipo S, porém na maior dose testada equivalente a 6X a dose de rótulo ( $240\ g\ i.a.ha^{-1}$ ) a produção de MSPA para os biótipos R ALS e R ALS/PPO foi de 63 e 66%, respectivamente (Figura 15D).

Para o herbicida flucarbazone a MSPA produzida no biótipo S com a dose de rótulo ( $30\ g\ ha^{-1}$ ) foi de 65% e nesta mesma dose 31% de controle foi observado no biótipo R ALS. Em contrapartida, o biótipo com resistência múltipla não foi controlado nem na maior dose testada de  $300\ g\ ha^{-1}$  (10X a dose de rótulo) deste herbicida (Figura 14E).

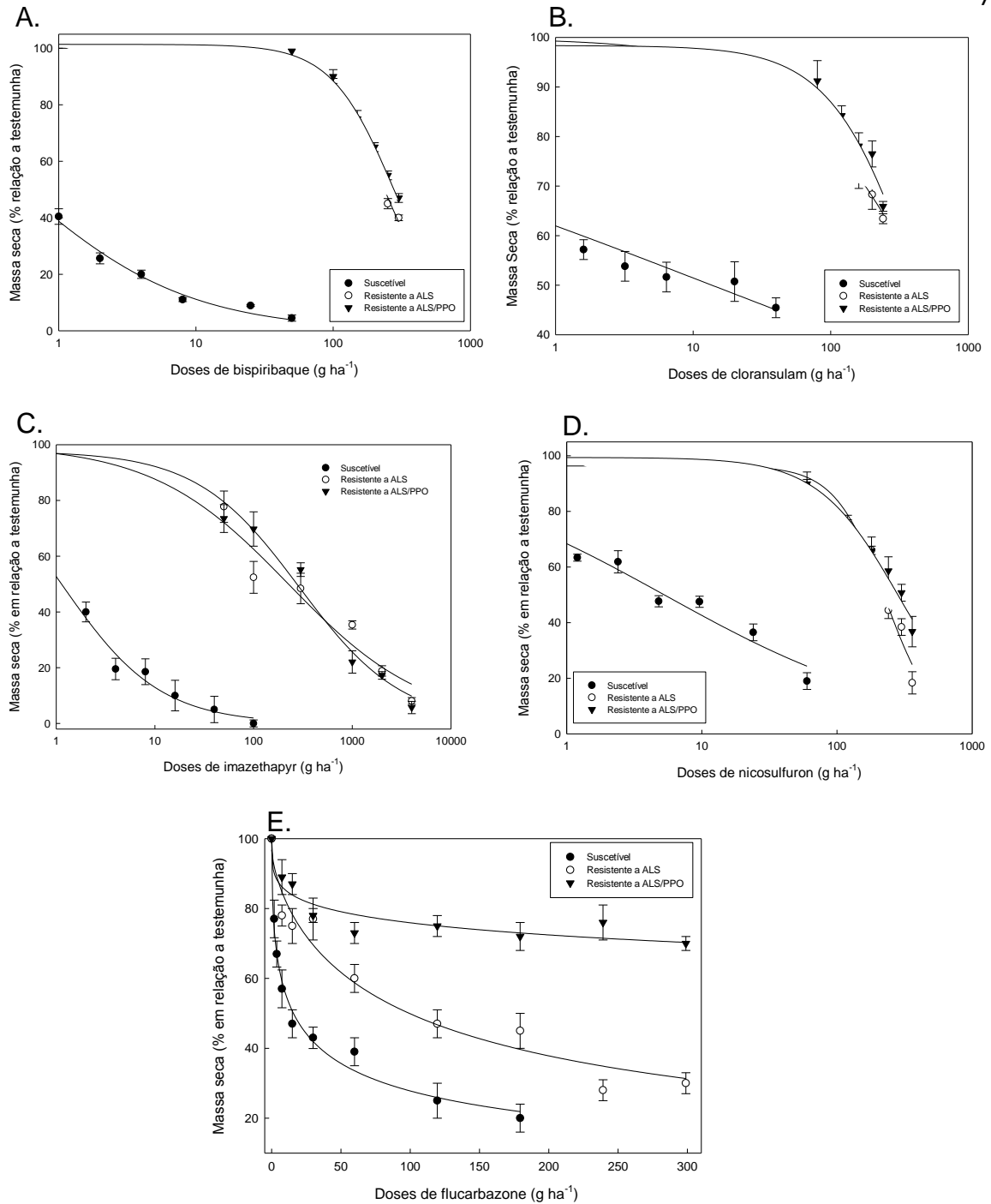


FIGURA 15. Efeito dos herbicidas pertencentes aos cinco grupos químicos dos inibidores da ALS (A. imazethapyr; B. nicosulfuron; C. bispiribaque; D. cloransulam; e E. flucarbazone) na massa seca da parte aérea (MSPA) em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e resistente. Porto Alegre-RS, 2012 e Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias  $\pm$  SE (n=4).

Os resultados obtidos com a variável MSPA corroboram com os obtidos com a variável controle. Para a MSPA a resistência também foi confirmada nos cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS (IMI, SU, PTB, TP e SCT).



#### 4.1.2 Ensaios enzimáticos

A análise da atividade enzimática da ALS mostrou padrão de resistência cruzada semelhante do obtido com a análise da variável controle e MSPA. A resistência foi confirmada nos quatro grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS (IMI, SU, PTB e TP) testados (Tabela 9). O ensaio enzimático não foi conduzido para o herbicida flucarbazone pertencente ao grupo químico SCT.

Elevados FR ( $I_{50}R/I_{50}S$ ) foram determinados para todos os herbicidas avaliados. Para o herbicida imazethapyr, em relação ao biótipo R ALS o FR foi 398, enquanto para o biótipo R ALS/PPO o FR foi 588 (Tabela 9). Os valores de  $I_{50}$  para este herbicida foram superiores a 3X e 5X a dose de rótulo do herbicida imazethapyr ( $100 \text{ g ha}^{-1}$ ) nos biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Tabela 9).

TABELA 9. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de redução da atividade enzimática ( $I_{50}$ ) de biótipos de *E.heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX.Fayetteville-AR, 2012-13.

Biótipos	Herbicidas	Parâmetros da regressão <sup>1</sup>					FR
		a	b	$Xa_{50}$	$I_{50}$	R <sup>2</sup>	
S	imazethapyr	100,3(3,1) <sup>2***3</sup>	0,5(0,04) <sup>***</sup>	0,8(0,2)*	1	0,99 <sup>***</sup>	-
R ALS		99,5(5,7) <sup>***</sup>	0,6(0,1) <sup>**</sup>	381,5(122,6)*	382	0,98 <sup>**</sup>	382
R ALS/PPO		103,3(8,1) <sup>***</sup>	0,6(0,1)*	588,2(270)*	588	0,96 <sup>**</sup>	588
S	chlorimuron	97,2(7,6) <sup>***</sup>	0,4(0,1)*	0,6(0,4)*	1	0,97 <sup>**</sup>	-
R ALS		102,8(7,9) <sup>***</sup>	0,5(0,1)*	251,8(149)*	252	0,95 <sup>**</sup>	252
R ALS/PPO		102,5(3,9) <sup>***</sup>	0,5(0,1) <sup>**</sup>	508,1(167)*	508	0,98 <sup>**</sup>	508
S	pirtiobaque-sódico	98,4(4,4) <sup>***</sup>	0,6(0,1) <sup>**</sup>	6,4(1,6)*	6	0,99 <sup>***</sup>	-
R ALS		100,8(9,2) <sup>***</sup>	0,3(0,1)*	1636(1537) <sup>**</sup>	1636	0,93*	273
R ALS/PPO		100,8(7,4) <sup>***</sup>	0,3(0,1)*	2699(2000)*	2699	0,99 <sup>**</sup>	450
S	cloransulam-metil	102,6(11,2) <sup>***</sup>	0,4(0,1)*	7,4(6,3) <sup>*s</sup>	7	0,92*	-
R ALS		100,0(7,8) <sup>***</sup>	0,4(0,1)*	947,1(676)*	947	0,94*	135
R ALS/PPO		101,3(4,6) <sup>***</sup>	0,4(0,1)*	3986(2280) <sup>**</sup>	3986	0,96 <sup>**</sup>	569

<sup>1</sup>Equação logística de 3 parâmetros  $f = a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b)$ ;

<sup>2</sup>Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média;

<sup>3</sup>Significância pelo teste 't' ao nível de: \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=ausência de significância.

Para o herbicida pirtiobaque os FR determinados para os biótipos R ALS e R ALS/PPO foram 273 e 508, respectivamente. As doses que reduziram a atividade da enzima ALS para este herbicida foram superiores a 10X a dose de

rótulo ( $140 \text{ g ha}^{-1}$ ) (Tabela 9). Para o herbicida cloransulam o FR observado para o biótipo R ALS/PPO foi 569 (Tabela 9).

De maneira geral, para todos os herbicidas, a atividade da enzima ALS foi reduzida a medida em que se aumentou a dose dos herbicidas (Figura 16).

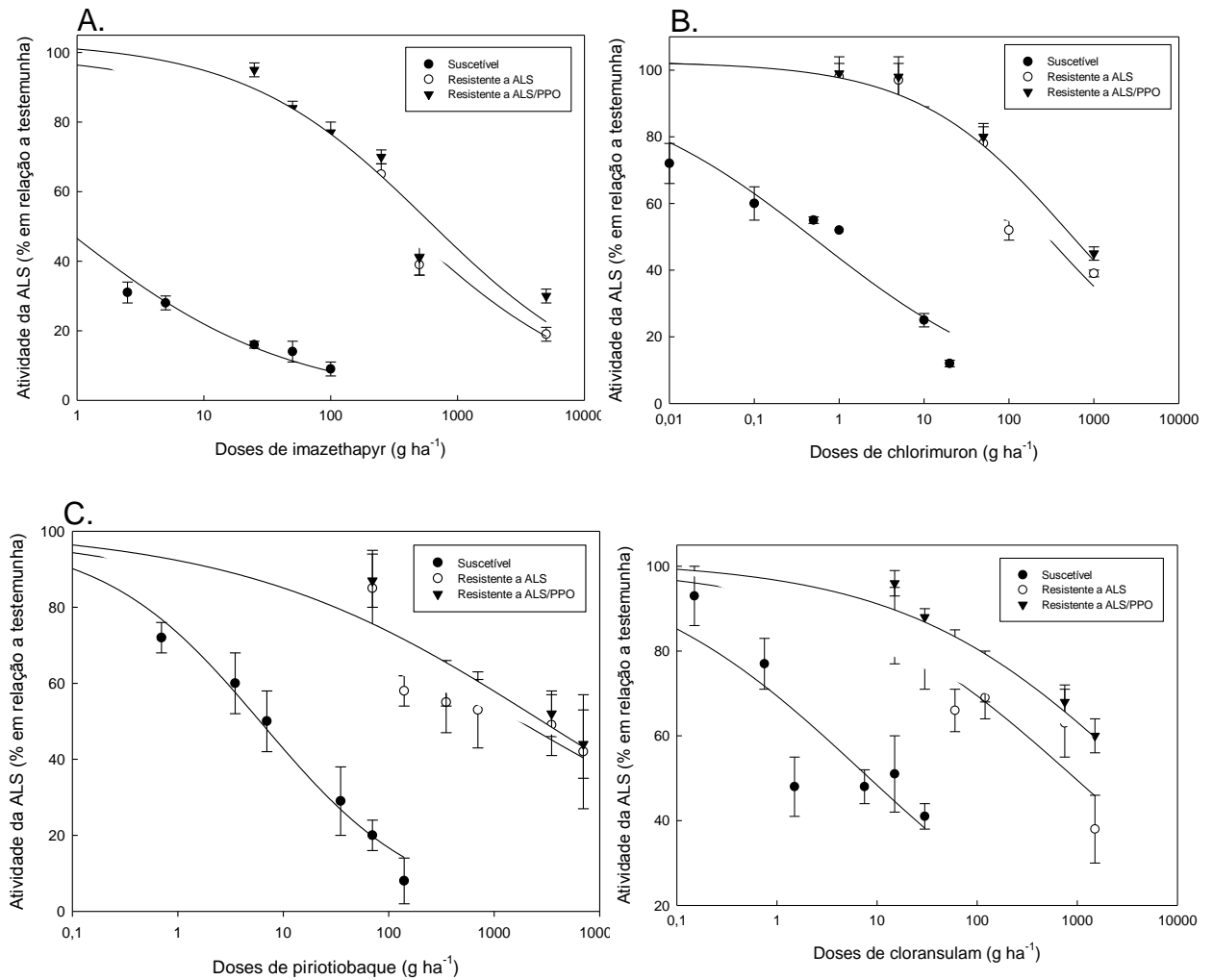


FIGURA 16. Efeito dos herbicidas pertencentes à quatro grupos químicos dos inibidores da ALS (A. imazethapyr; B. nicosulfuron; C. pyriothioac; e D. cloransulam) na atividade enzimática de biótipos de *E. heterophylla* suscetível e resistente. Fayetteville-AR, 2012-13. Dados são as médias  $\pm$  SE (n=4).

Para o herbicida imazethapyr, na dose recomendada, a atividade enzimática observada no biótipo S foi 9%, enquanto que, para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, a atividade enzimática foi de 67 e 77%, respectivamente (Figura

16A). A atividade da enzima ALS da ordem de 12% para o biótipo S e 79 e 85% para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente, foram determinados na dose recomendada do herbicida chlorimuron (Figura 16B). Para o herbicida piritiobaque, na dose recomendada, a atividade da enzima ALS foi de 8, 58 e 65% para os biótipos S, R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Figura 16C). Atividades enzimáticas de 41, 77 e 88% para os biótipos S, R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Figura 16D), foram observadas para o herbicida cloransulam.

#### **4.2 Herança do gene ALS (LE2)**

As análises de curva de dose-resposta em relação ao controle e massa seca da parte aérea nos biótipos parentais suscetível, resistente a ALS e com resistência múltipla confirmaram a suscetibilidade no parental S e resistência ao herbicida nos parentais R (Figura 17).

Analisando os resultados obtidos com os parentais pode-se observar que as doses do herbicida imazethapyr necessárias para reduzir 50% do controle ( $C_{50}$ ) foram 11, 614 e 644 g ha<sup>-1</sup> para os biótipos S, R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Tabela 10). Os fatores de resistência em relação ao controle foram 56 e 59 para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Tabela 10). Entretanto, para a variável MSPA o nível de resistência observado foi superior aos encontrado na análise de curva dose-resposta em relação ao controle (Tabela 11). Os FR em relação MSPA foram 226 e 291 para os biótipos R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Tabela 11). As doses do herbicida imazethapyr necessárias para reduzir 50% da MSPA ( $GR_{50}$ ) foram 1, 226 e 291 g ha<sup>-1</sup> para os biótipos S, R ALS e R ALS/PPO, respectivamente (Tabela 11).

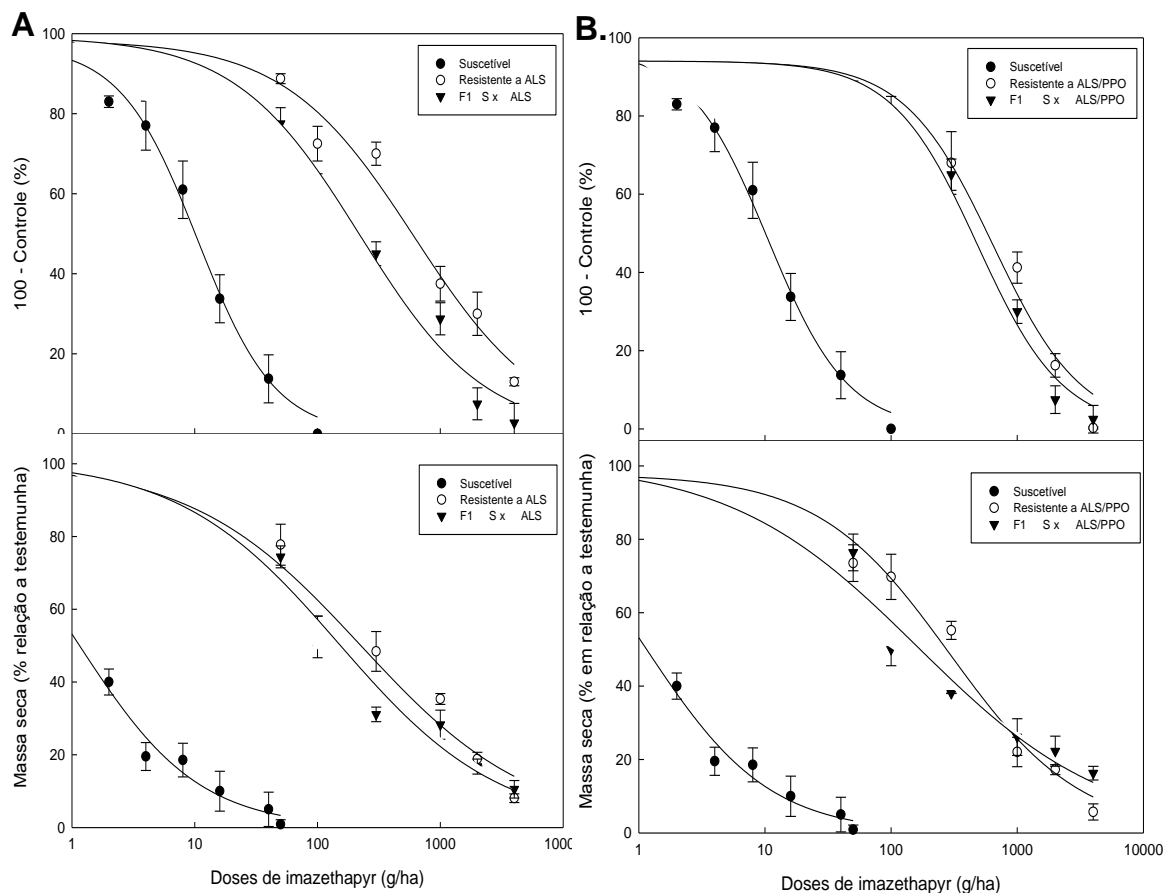


FIGURA 17. Efeito de doses crescentes do herbicida imazethapyr sobre os parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) e sobre as gerações F1 ♀S x ♂ALS (A) e F1 ♀S x ♂ALS/PPO (B) em relação a variável 100-controle (%) (gráfico acima) e em relação a massa seca da parte aérea (gráfico abaixo). Porto Alegre-RS, 2012. Dados são as médias  $\pm$  SE (n=4).

TABELA 10. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter 50% de controle ( $C_{50}$ ) de biótipos de *E. heterophylla* parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) e de gerações F1 (♀S x ♂ALS e ♀S x ♂ALS/PPO) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipo	Imazethapyr					
	a	b	Xa <sub>50</sub>	C <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	FR
Suscetível	96,9(3,6) <sup>2***3</sup>	1,4(0,2)**	10,6(1,1)***	11	0,99***	-
Resistente a ALS	98,4(5,6)***	0,8(0,1)**	614,4(152)**	614	0,98***	56
F1 ♀S x ♂ALS	99,3(5,4)***	0,9(0,1)**	221,6(48,6)**	222	0,99***	20
Resistente a ALS/PPO	93,9(5,6)***	1,2(0,3)**	643,5(145)***	644	0,98***	59
F1 ♀S x ♂ALS/PPO	94,1(5,0)***	1,3(0,2)**	484,1(94,1)**	484	0,99***	44

<sup>1</sup> Equação logística de 3 parâmetros  $f = a/(1+abs(x/x_0)^b)$ ;

<sup>2</sup> Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média;

<sup>3</sup> Significância pelo teste 't' ao nível de: \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=ausência de significância.

TABELA 11. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas necessária para obter redução de 50% da massa seca de parte aérea (GR<sub>50</sub>) de biótipos de *E. heterophylla* parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) e de gerações F1 (♀S x ♂ALS e ♀S x ♂ALS/PPO) aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipo	Imazethapyr					
	a	b	Xa <sub>50</sub>	C <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	FR
Suscetível	100,1(3,6) <sup>2***3</sup>	0,9(0,1)**	1,2(0,3)*	1	0,99***	-
Resistente a ALS	99,9(7,3)***	0,6(0,1)**	225,5(84,9)*	226	0,98**	226
F1 ♀S x ♂ALS	101,0(6,1)***	0,6(0,1)**	149,3(43,1)*	149	0,98***	149
Resistente a ALS/PPO	97,7(5,3)***	0,8(0,1)**	290,9(65,9)*	291	0,98***	291
F1♀S x ♂ALS/PPO	101,1(6,6)***	0,6(0,1)**	163,7(56,8)*	164	0,99***	164

<sup>1</sup> Equação logística de 3 parâmetros  $f = a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b)$ ;

<sup>2</sup> Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média;

<sup>3</sup> Significância pelo teste 't' ao nível de: \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=ausência de significância.

Analisando os resultados obtidos com as gerações F1 ♀S x ♂R ALS e F1 ♀S x ♂R ALS/PPO identificou-se valores de C<sub>50</sub> iguais a 222 e 484 g i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo essas doses duas e quatro vezes superior a dose de rótulo do herbicida (100 g/ha) (Tabela 10). Os fatores de resistência obtidos destes cruzamentos foram 20 e 44, respectivamente (Tabela 10). Já os FR obtidos pela análise da MSPA foram 149 e 164 para as gerações F1 ♀S x ♂R ALS e F1 ♀S x ♂R ALS/PPO, respectivamente, sendo estes valores superiores aos observados na análise de curva dose-resposta em relação a variável controle (Tabela 11).

Os resultados obtidos pela análise de curvas de dose-resposta em relação ao controle e pela MSPA em ambas as gerações F1 demonstram que a resistência é transmitida hereditariamente e é dominante (Figura 17). O número de plantas F1 resistentes obtidas em ambos cruzamentos foi igual ao número total de plantas testadas para o teste de segregação R:S (Tabela 12). Assim, a segregação fenotípica observada nas gerações F1 de ambos os cruzamentos foi 3:1 indicando o caráter monoíbrido da herança, ou seja, a resistência nas gerações F1 é devido a apenas um único gene de herança nuclear (Tabela 12).

TABELA 12. Avaliação da segregação da resistência de cruzamentos entre biótipos de *E. heterophylla* parentais (S, R a ALS e R ALS,PPO) sob as gerações F1 ( $\text{♀S} \times \text{♂ALS}$  e  $\text{♀S} \times \text{♂ALS/PPO}$ ) aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipos	imazethapyr (200 g ia.a ha <sup>-1</sup> )			Relação		X <sup>2</sup> cal	X <sup>2</sup> tab <sup>3</sup>	Probabilidade
	Plantas	R	S	e <sup>1</sup>	o <sup>2</sup>			
S	164	0	164	-	-	-	-	
R ALS	143	143	0	-	-	-	-	
R ALS/PPO	171	171	0	-	-	-	-	
F1 $\text{♀S} \times \text{♂ALS}$	23	23	0	1:0	1:0	0	3,84	1,00
F2 $\text{♀S} \times \text{♂ALS}$	121	87	34	3:1	3,1:0,9	1,34	3,84	0,90
F1 $\text{♀S} \times \text{♂ALS/PPO}$	21	21	0	1:0	1:0	0	3,84	1,00
F2 $\text{♀S} \times \text{♂ALS/PPO}$	157	112	45	3:1	3,2:0,9	1,40	3,84	0,98

<sup>1</sup>Valor esperado;

<sup>2</sup>Valor observado;

<sup>3</sup>Valor do qui-quadrado tabelado com GL=1 a 5% de probabilidade.

Na segregação fenotípica das gerações F1 em ambos cruzamentos os valores de qui-quadrado calculados foram iguais a zero e portanto menores do que os valores de qui-quadrado tabelados ( $X^2_{\text{tab}}=3,84$ ). Assim, assume-se como verdadeiro que os desvios ocorrem ao acaso e os valores obtidos de fato correspondem a proporção 1:0 (Tabela 12). A probabilidade da segregação R/S de 1:0 nas gerações F1  $\text{♀S} \times \text{♂R ALS}$  e F1  $\text{♀S} \times \text{♂R ALS/PPO}$  é de 100% em ambos cruzamentos (Tabela 12).

Na segregação fenotípica das gerações F2 de ambos cruzamentos os valores de qui-quadrado calculados também foram menores do que os valores de qui-quadrado tabelados ( $X^2_{\text{tab}}=3,84$ ). Assim, os valores obtidos de fato correspondem a proporção 3:1 (Tabela 12). Na segregação fenotípica das gerações F2 dos cruzamentos  $\text{♀S} \times \text{♂R ALS}$  e  $\text{♀S} \times \text{♂R ALS/PPO}$  os valores de qui-quadrado calculados foram de 3,1:0,9 e 3,2:0,9 com probabilidades de 90% e 98% de serem 3:1 (Tabela 12).

As gerações F1 e F2 de ambos cruzamentos apresentaram alta probabilidade para o padrão de segregação 1:0 e 3:1, respectivamente, indicando que a herança aos herbicidas inibidores da ALS tanto nos biótipos R ALS quanto nos biótipos com resistência múltipla R ALS/PPO é governada por um único gene nuclear dominante.

### 4.3 Citogenética (LE3)

Na LE3, inicialmente serão apresentados os resultados obtidos com a determinação do número cromossômico somático e com a descrição do cariótipo. Posteriormente serão mostrados os resultados relacionados a análise do comportamento meiótico e da viabilidade de grãos de pólen.

#### 4.3.1 Número cromossômico e cariótipo

A determinação do nível de ploidia ocorreu através da contagem do número cromossômico em células meristemáticas de ponta de raiz. O número cromossômico encontrado foi  $2n=28$  e não ocorreram diferenças neste número em relação aos biótipos resistentes e o suscetível (Figura 18). Assim, tanto os biótipos de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas quanto o biótipo suscetível são tetraplóides, assumindo número básico  $X=7$  (SUDA, 2001, AARESTRUP *et al.*, 2008a).

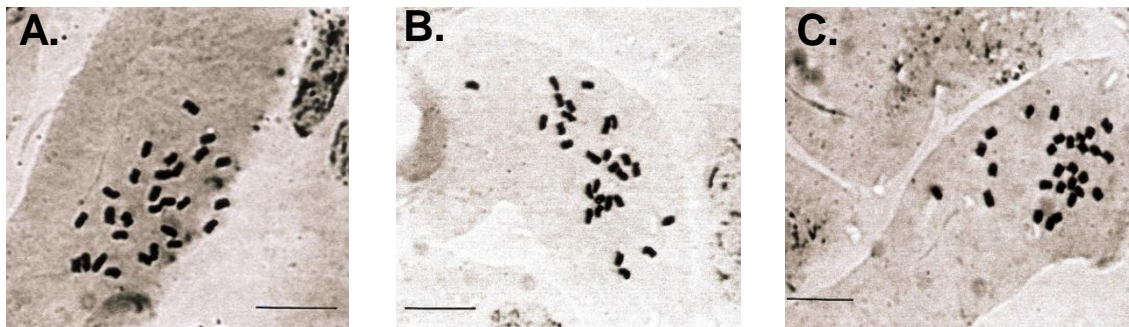


FIGURA 18. Número cromossômico de células meristemáticas de ponta de raiz da espécie *E. heterophylla*. A) Biótipo com resistência múltipla aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX; B) Biótipo com resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS; C) Biótipo suscetível. Barra equivale a 10  $\mu$ m. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Os cromossomos de *E. heterophylla* ( $2n=28$ ) são muito pequenos, variando de 1,5 a 2,2  $\mu$ m de comprimento. O cariótipo é composto de 12 pares de cromossomos meta ou submetacêntricos, um par de cromossomos acrocêntricos

e um par de cromossomos satélites metacêntricos, sendo o satélite quase do mesmo tamanho do braço cromossômico (Figura 19).

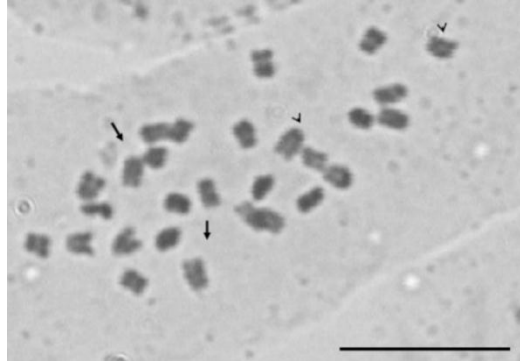


FIGURA 19. Cariótipo de *E. heterophylla* composto de 12 pares de cromossomos meta ou submetacêntricos, um par de cromossomos acrocêntricos (cabeça de seta) e um par de cromossomos satélites metacêntricos (seta). Barra equivale a 10  $\mu$ m. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

O acrocêntrico e o cromossomo satélite estão entre os maiores do cariótipo. Conforme descrito nos materiais e métodos foram analisados cerca de 50 células com bom espalhamento dos cromossomos por biótipo. Entretanto, como os cromossomos são muito pequenos, não foi possível construir o ideograma pois as medidas não permitiram uma determinação precisa dos índices centroméricos.

#### 4.3.2 Comportamento meiótico e viabilidade do pólen

A análise do comportamento meiótico revelou a presença de cromossomos univalentes (Figura 20A), bivalentes (Figura 20B), trivalentes (Figura 20C) e tetravalentes (Figura 20D). No total foi possível analisar 39 células do biótipo R a ALS/PPO, 7 células do biótipo R a ALS e 7 células meióticas do biótipo suscetível (Tabela 13). Identificou-se células nas fases anáfase I (Figura 21A), anáfase II (Figura 21B), metáfase I (Figura 21C), telófase I (Figura 21D), telófase II (Figura 21E) e células em diacinese (Figura 21F). O comportamento meiótico foi irregular apresentando associações cromossômicas múltiplas porém ao final do ciclo



celular o comportamento meiótico apresentou disjunção regular o que explica a alta viabilidade dos grãos de pólen.

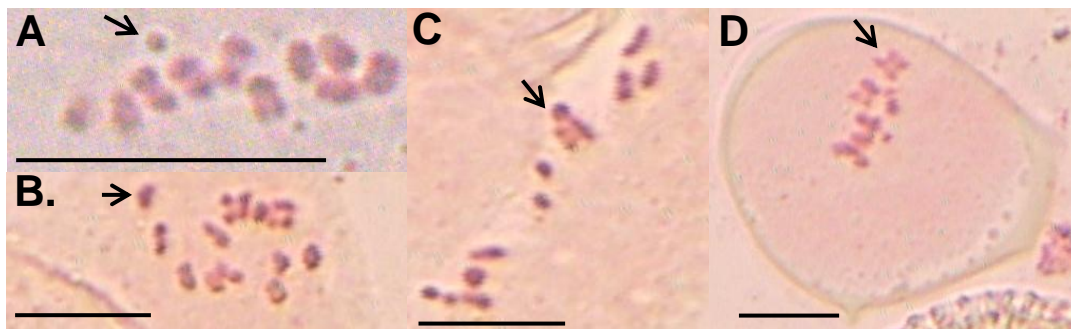


FIGURA 20. Células em metáfase I de biótipos de *E. heterophylla* resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. A) Seta indica um cromossomo univalente; B) Seta indica um cromossomo bivalente; C) Seta indica um cromossomo trivalente; D) Seta indica um cromossomo tetravalente. Barra equivale a 10 µm. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.



FIGURA 21. Fases da meiose identificadas no biótipo de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. A) Célula em anáfase I; B) Célula em anáfase II; C) Célula em metáfase I; D) Célula em telófase I; E) Célula em telófase II; e F) Célula em diacinese. Barra equivale a 10 µm. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

TABELA 13. Número de células encontradas em biótipos de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX (R ALS/PPO), resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS (R ALS) e no biótipo suscetível (S). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipo	Fase meiótica						Total
	Anáfase I	Anáfase II	Metáfase I	Telófase I	Telófase II	Diacinese	
R ALS/PPO	5	1	29	1	1	2	39
R ALS	5	-	2	-	-	-	7
S	1	-	6	-	-	-	7

Para a análise de grãos de pólen foram analisadas cinco plantas por biótipo. No total foram contados 2864, 1711 e 3185 grãos de pólen dos biótipos R ALS/PPO, R ALS e S, respectivamente (Tabela 14). A porcentagem observada de viabilidade dos grãos de pólen foi de 99%, 94% e 99% para os biótipos R ALS/PPO, R ALS e S, respectivamente (Tabela 14).

TABELA 14. Análise da viabilidade de grãos de pólen em biótipos de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX (R ALS/PPO), resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS (R ALS) e no biótipo suscetível (S). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipo	Graus de coloração de pólen viável			Inviável	Total
	BC <sup>1</sup>	PC <sup>2</sup>	NC <sup>3</sup>		
R ALS/PPO	385(13%) <sup>4</sup>	2207(77%)	263(9%)	9(0,31%)	2864
R ALS	332(19%)	1199(70%)	78(5%)	102(6%)	1711
S	787(25%)	2264(71%)	125(4%)	9(0,28%)	3185

<sup>1</sup>Bem corado;

<sup>2</sup>Pouco corado;

<sup>3</sup>Não corado;

<sup>4</sup>valores entre parênteses significam a porcentagem em relação ao total de grãos de pólen analisados.

A análise da viabilidade de grãos de pólen revelou diferenças com relação a coloração dos grãos. Considerou-se pólen viável aqueles classificados como bem corados (BC), pouco corados (PC) e não corados (NC), enquanto foram considerados inviáveis os grãos de pólen vazios (Figura 22).



FIGURA 22. Graus de coloração dos grãos de pólen. A) Bem corado (BC); B) Pouco corado (PC); C) Não corado (NC); D) Inviável. Barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ . UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

As diferenças nos graus de coloração do pólen viável deve-se a maturação desuniforme das anteras nos filamentos. No caso de *E. heterophylla* os filamentos são formados por 6 anteras e observou-se que a maturação ocorre na direção do topo para a base do filamento (Figura 23). Desta forma, em uma mesma lâmina observou-se diferentes colorações de grãos de pólen devido a diferentes níveis de maturação das anteras.

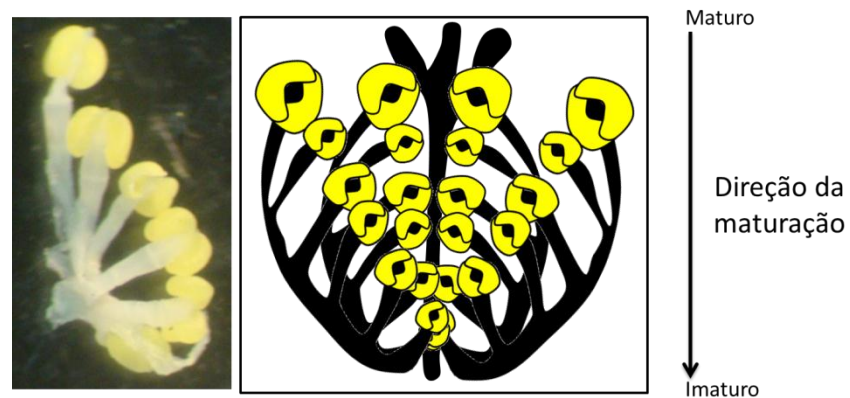


FIGURA 23. Esquema mostrando a direção de maturação das anteras que ocorre do topo em direção a base da inflorescência. Cada inflorescência de *E. heterophylla* é formada por 4 estiletes ou filamentos contendo 6 anteras em cada filamento. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

#### 4.4 Estudos moleculares (LE4)

Para o isolamento do gene *als* em *E. heterophylla* foi necessária a realização de diferentes etapas de acordo com os procedimentos utilizados para o desenho dos primers. Na primeira e segunda tentativa optou-se pela utilização de

DNA como material genômico para as reações de PCR. Foram testados entre primers degenerados e regulares um total de 12 pares nestas duas etapas.

Os primers degenerados (Tabela 3) não tiveram sucesso em nenhuma das reações de PCR testadas. Os primers regulares (Tabelas 3 e 4) resultaram em diferentes fragmentos no gel (Figura 24) e não em apenas uma banda única. As bandas no gel cujos primers correspondiam ao tamanho esperado para o gene ALS foram recortadas e purificadas conforme descritas no item 3.5 do presente trabalho. Entretanto a análise das sequências nucleotídicas destes fragmentos revelou não se tratar do gene ALS.

Por este motivo foi necessário uma terceira abordagem para o desenho dos primers. Nesta etapa os primers foram desenhados manualmente por meio de alinhamento da sequência de aminoácidos e com base em diferentes espécies de dicotiledôneas. Ademais, as reações de PCR que utilizaram estes primers foram conduzidas com RNA como material genético. No total foram testados dois primers regulares e um primer degenerado. Apenas o primer denominado ALS 3 (Tabela 5) resultou em bandas no gel com tamanho correspondente ao esperado de 169 pb (Figura 25).

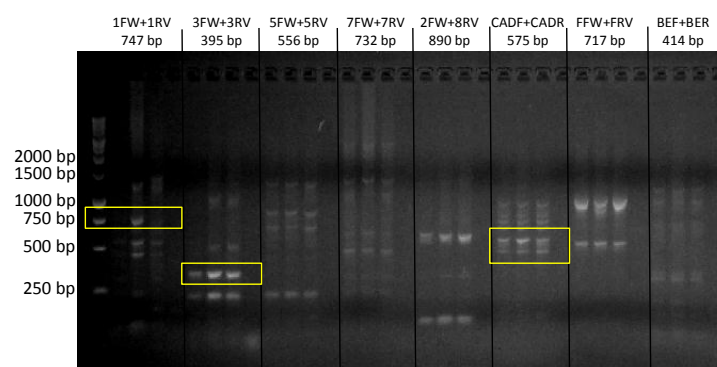


FIGURA 24. Gel mostrando reação de PCR em que foram utilizados os primers correspondentes as etapas 1 e 2 para o isolamento do gene *als*. A primeira coluna indica o marcador de peso molecular de 1kb. As demais colunas são os primers utilizados com o respectivo tamanho de fragmento esperado. A ordem nas colunas dentro de cada primer é S, R ALS, R ALS/PPO e branco. Fayetteville-AR, 2012.

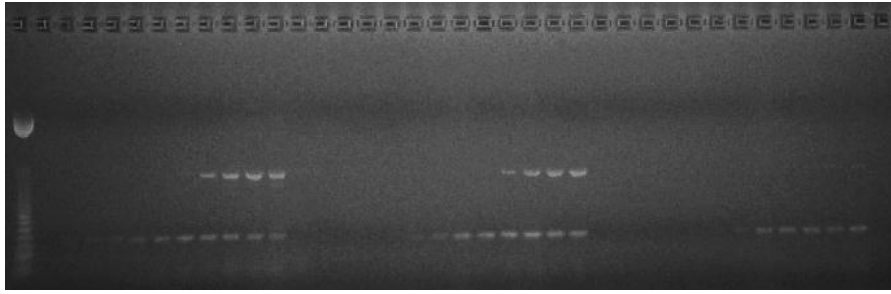


FIGURA 25. Gel mostrando reação de PCR em que foram utilizados os primers da terceira etapa para o isolamento do gene *als*. A primeira coluna indica o marcador de peso molecular de 50 pb. As demais colunas são os biótipos S, R ALS, R ALS/PPO e branco sob diferentes temperaturas de anelamento. Fayetteville-AR, 2013.

O resultado do sequenciamento dos fragmentos purificados direto do gel e das reações de PCR em que se obtiveram bandas únicas, mostrou que as sequências nucleotídicas de fato se tratavam do gene *als* (Figura 26), pois alinharam com similaridade >70% com o gene *als* identificado em outras espécies. Não foram identificados diferenças entre os biótipos testados.

Helianthus	CGGTCAATGGAGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCAACACCATCCGCAATGTCCTCCC	369
Conyza	GCGTCAATGGAGATCCACCAAGCTCTCACGCGCTCCACCACCATCCGCAACGTCCTCCC	229
Amaranthus	GCTTCCATGGAAATCCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAAATGTTCTTCT	408
Euphorbia	-----GGAGTTGCAC-----ATCCG-CAGTCCTCCC	27
Ricinus	GCCTCCTTGGAGATCCACCAAGCTCTAACACGCTCGCCAATTATCCGTAATGTTCTTCCA	442
Gossypum	GCTTCAATGGAGATCCACCAGGCTTTAACCCTGCTCAAAAATCATCCGAAATGTCCTTCCG	540
	***.:* ** ** . * . * * * * *	
Helianthus	CGTCACGAACAGGGCGGCGTGTTCGCCGCGAAGGCTACGCACGCGCTCCGGTCTTCCC	429
Conyza	CGCCATGAACAAGGTGGCATCTTCGCCGCGAAGGCTACGCACGTGCTCCGGTCTCCC	289
Amaranthus	CGACATGAACAAGGTGGGGTTTTCTGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTCTACTGGACGTGT	468
Euphorbia	CGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCTGAAGGATACGCCCGCGCTCCGGCAAGCCC	87
Ricinus	CGACACGAACAAGGTGGAGTCTTTGCTGCGAAGGTTATGCCGTTCTTCGGAAACCC	502
Gossypum	CGACACGAGCAAGGTGGGGTCTTTGCCGCGAGGCTACGCGCGCTCCTCTGGCATTCCC	600
	** * * * * . * * * * . *	
Helianthus	GGCGTGTGTATCGCCACTTCCGGTCCCGGAGCTACGAACCTAGTTAGTGGTCTTGCTGAC	489
Conyza	GGCGTCTGTATAGCCACTTCCGGTCCCGGCGCCACAAACCTTGTCTCCGGCTTGCTGAC	349
Amaranthus	GGAGTTTGTATTGCCACTTCTGGTCCGGGTGCTACTAATCTTGTTCGGTTTTGCTGAT	528
Euphorbia	GGCGTGTGCATCGGCACCTCCGGCCAGGCGCCACCAATCTCGTCAGCGGTTAAG-----	142
Ricinus	GGTGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCGGCGCCACCAATCTCGTCAGCGGTTTAGCTGAC	562
Gossypum	GGCGTTTGATTGCGACGTCTGGCCCTGGGGCAACCAACTTGGTGTAGTGGTCTCGCTGAT	660
	** *	
Helianthus	GCGTTGTTAGACAGTGTCCCATGGTGGCAATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATC	549
Conyza	GCGTTCTTGACAGTGTCCCCTGCTTGGCCATCACCGGCAAGTTCCCGGCAATGATC	409
Amaranthus	GCACTTCTTGACTCAGTCCCGCTTTCGCCATTACTGGGCAAGTTCTCCGGCGTATGATT	588
Euphorbia	-----TCA-----	145
Ricinus	GCTCTCCTTGATAGTGTCCCATTGTGGTATCACTGGTCAAGTTCTCGTAGAATGATT	622
Gossypum	GCAATGCTCGATAGTATCCCTCTCGTGGCGATCACTGGTCAAGTCCCTCGTCGGATGATC	720

FIGURA 26. Alinhamento da sequência nucleotídica de *E. heterophylla* obtida com a utilização do *primer* ALS 3 com diferentes espécies. Fayetteville-AR, 2013. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

#### 4.5 Germinabilidade em *E. heterophylla* (LE5)

Nas temperaturas de 16, 20, 26 e 32°C a germinação foi significativamente maior das sementes de 2 meses de idade em relação as sementes de 12 meses de idade (Figuras 27-30; Tabela 15). O máximo de germinação alcançada nas sementes de 12 meses de idade foi 63% na temperatura de 26°C para o biótipo com resistência múltipla (R ALS/PPO) (Figura 29B).

Na temperatura de 16°C, em sementes de 2 meses de idade a germinação iniciou-se a partir do terceiro dia de incubação e os máximos de germinação alcançados aos 17 dias, para os biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS (R ALS), R ALS/PPO e suscetível (S) foram 12, 10 e 4%, respectivamente (Figura 27A). Esses valores foram ainda inferiores nas sementes de 12 meses de idade sendo 2, 5, e 4% para os biótipos R ALS, R ALS/PPO e S (Figura 27B). Nessas sementes a germinação iniciou-se a partir do quarto dia de incubação.

Nas sementes de 2 meses de idade, na temperatura de 16°C a partir do 15º dia ocorreu um aumento na germinação do biótipo R ALS corroborando a hipótese de que plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS germinam mais sob baixas temperaturas. Outro experimento conduzido previamente mostrou esse mesmo padrão de germinação, em que o biótipo R ALS germinou mais sob baixa temperatura. Entretanto, não foi observado germinação maior do biótipo R ALS sob baixa temperatura nas sementes com 12 meses de idade. Nestas sementes a germinação dos biótipos R ALS foi inferior aos demais biótipos em estudo (Figura 27B).

TABELA 15. Parâmetros da equação logística<sup>a</sup> utilizada na análise da curva de dose resposta em função da germinação acumulada de sementes com 12 meses de idade (V) e com 2 meses de idade (N) de biótipos de *Euphorbia heterophylla* (L.) suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, sob diferentes temperaturas. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2011.

Biótipo	16°C			
	a	b	X <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
S V	5,00(0,19) <sup>b***c</sup>	-2,99(0,3)**	6,27(0,3)***	0,99***
R a ALS V	2,14(0,2)***	-5,18(1,3)**	8,57(0,5)***	0,97***
R a ALS/PPO V	3,98(0,3)***	-7,93(1,5)***	11,67(0,4)***	0,98***
S N	5,00(1,03)***	-2,81(0,8)**	9,54(1,7)***	0,96***
R a ALS N	29,01(15,3)*	-2,16(0,4)***	19,99(8,5)*	0,99***
R a ALS/PPO N	12,37(1,1)***	-2,39(0,3)***	9,45(0,8)***	0,99***
20°C				
S V	50,16(1,15)***	-1,70(0,18)***	2,19(0,009)***	0,99***
R a ALS V	52,87(9,97)**	-1,4(0,28)**	7,57(2,14)**	0,99***
R a ALS/PPO V	25,69(0,75)***	-4,79(0,51)***	6,22(0,15)***	0,98***
S N	70,4(0,8)***	-3,2(0,2)***	2,9(0,2)***	0,99***
R a ALS N	63,4(1,6)***	-2,9(0,4)***	3,4(0,1)***	0,99***
R a ALS/PPO N	60,2(1,1)***	-4,2(0,5)***	3,7(0,1)***	0,99***
26°C				
S V	47,1(2,8)***	-1,4(0,2)***	2,5(0,3)***	0,98***
R a ALS V	45,6(8,4)***	-1,7(0,2)***	11,1(2,4)***	0,99***
R a ALS/PPO V	67,8(2,4)***	-1,9(0,1)***	3,5(0,2)***	0,99***
S N	97,2(0,2)***	-5,4(0,2)***	1,7(0,1)***	0,99***
R a ALS N	119,9(27811) <sup>ns</sup>	-0,02(21,1) <sup>ns</sup>	3,82.10 <sup>-20</sup> (2,3.10 <sup>-9</sup> ) <sup>ns</sup>	0,87***
R a ALS/PPO N	99,9(0,1)***	-5,3(0,04)***	1,6(0,004)***	1,00***
32°C				
S V	42,7(3,9) <sup>b***c</sup>	-1,5(0,2)***	5,5(0,8)***	0,99***
R a ALS V <sup>d</sup>	36,5(9,2)**	-1,8(0,3)***	11,8(3,4)**	0,99***
R a ALS/PPO V	61,2(1,9)***	-2,9(0,4)***	4,3(0,2)***	0,99***
S N	97,6(2,5)***	-2,2(0,3)***	2,5(0,1)***	0,99***
R a ALS N	108,5(2,9)***	-1,1(0,1)***	1,4(0,1)***	0,99***
R a ALS/PPO N	98,3(0,2)***	-3,3(0,1)***	1,8(0,1)***	0,99***

<sup>a</sup>Equação logística de 3 parâmetros  $f = a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b)$

<sup>b</sup>Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média

<sup>c</sup>Significância pelo teste 't' ao nível de: \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=ausência de significância

<sup>d</sup>Equação polinomial linear  $f = y_0 + a \cdot x$

Na temperatura de 20°C, em relação as sementes com 2 meses de idade, a germinação iniciou-se no segundo dia de incubação para os biótipos S e R ALS, enquanto para o biótipo R ALS/PPO a germinação iniciou no terceiro dia (Figura 28A). Para as sementes com 12 meses de idade, em 20°C, o início da germinação ocorreu no segundo dia de incubação para os biótipos S e R ALS/PPO, e no 4º dia para o biótipo R a ALS (Figura 28B). Nesta temperatura, em ambas as idades de sementes, o biótipo S apresentou porcentagem de germinação acumulada significativamente maior em relação aos biótipos resistentes (Tabela 15).

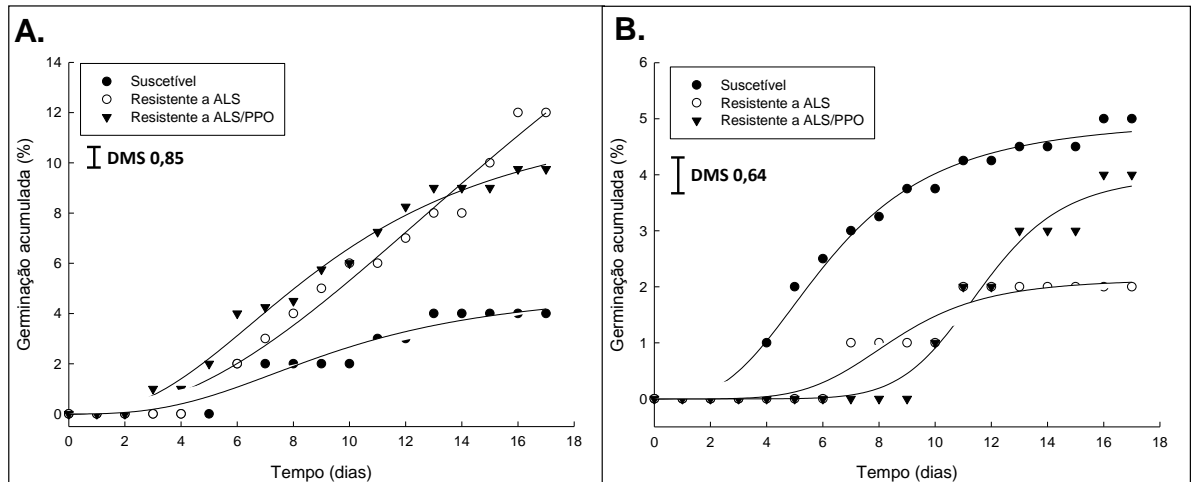


FIGURA 27. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de *E. heterophylla* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 16°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.

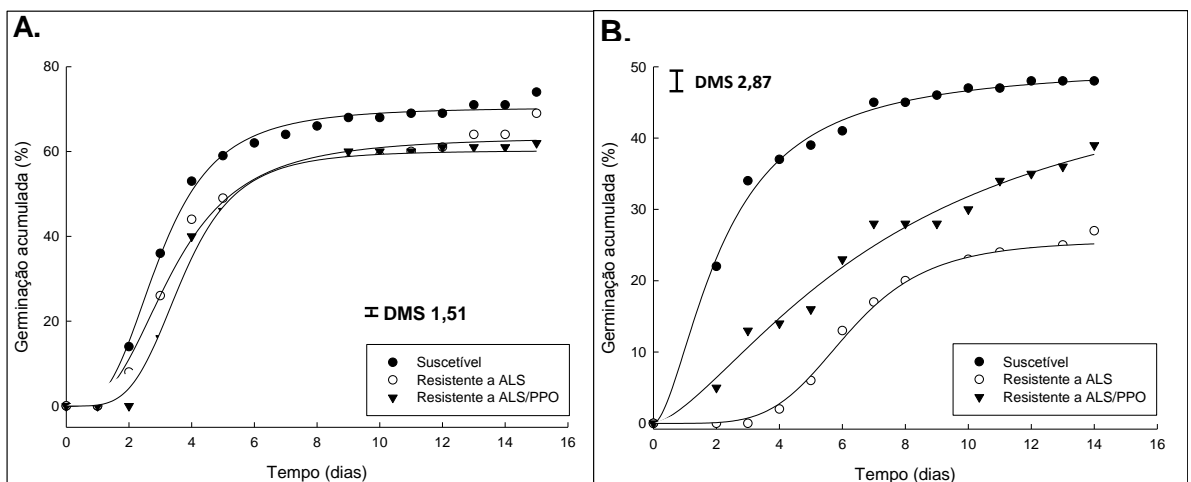


FIGURA 28. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de *E. heterophylla* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 20°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.

Em temperaturas mais elevadas como de 26°C a germinação observada foi superior as temperaturas mais baixas (Figura 29). Nesta temperatura a germinação iniciou no primeiro dia de incubação para todos os biótipos com sementes de 2 meses de idade e 100% de germinação acumulada do biótipo R ALS/PPO foi atingida no 5º dia (Figura 29A). Nas sementes com 12 meses de idade a germinação iniciou no primeiro dia de incubação para o biótipo S e no



segundo dia para os biótipos resistentes (Figura 29B). Destaca-se que nesta temperatura alcançou-se o máximo de germinação acumulada de 63% das sementes de 12 meses de idade no biótipo R ALS/PPO (Figura 29B).

De modo geral na temperatura de 26°C as sementes mais novas não diferiram quanto ao padrão de germinação acumulada sendo que todos os biótipos alcançaram níveis máximos de germinação (Figura 29A). Porém, nas sementes de 12 meses de idade os biótipos diferiram quanto ao padrão de germinação acumulada sendo o biótipo R ALS o que germinou menos (28%), o biótipo S intermediário (46%) e o biótipo R ALS/PPO obteve maior germinação (63%) (Figura 29B).

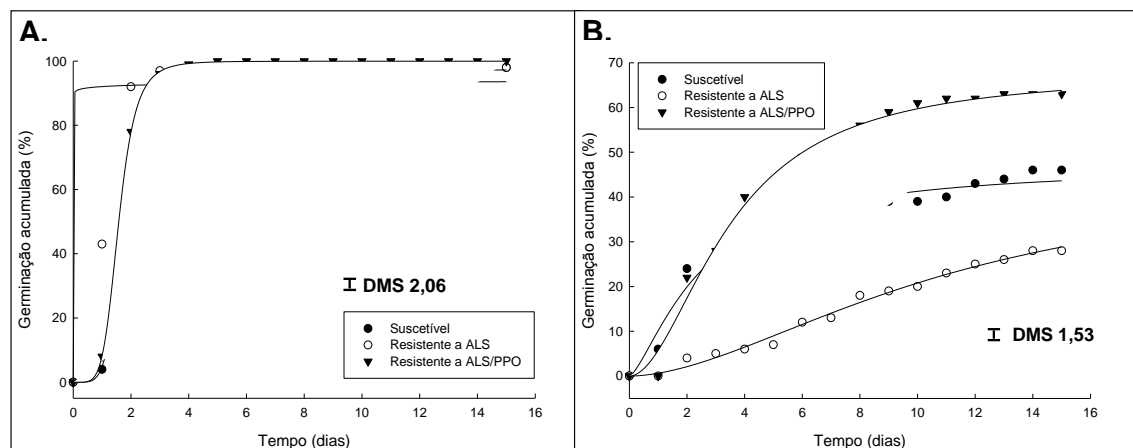


FIGURA 29. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de *E. heterophylla* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 26°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.

Na temperatura mais alta de 32°C, as sementes de 2 meses de idade de todos os biótipos em estudo iniciou-se no primeiro dia de incubação e os máximos de germinação alcançados foram 100, 98 e 100% para os biótipos R ALS, R ALS/PPO e S, respectivamente (Figura 30A).

Em sementes com 2 meses de idade não houve diferenças em relação ao padrão de germinação acumulada. Contudo, nas sementes com 12 meses de

idade o padrão de germinação acumulada observado foi significativamente diferente entre os biótipos sendo os máximos alcançados de 22, 59 e 35% para os biótipos R ALS, R ALS/PPO e S, respectivamente (Figura 30B, Tabela 15). Nestas sementes mais velhas a germinação iniciou-se no primeiro dia de incubação para os biótipos S e R ALS/PPO e no segundo dia para o biótipo R ALS (Figura 30B).

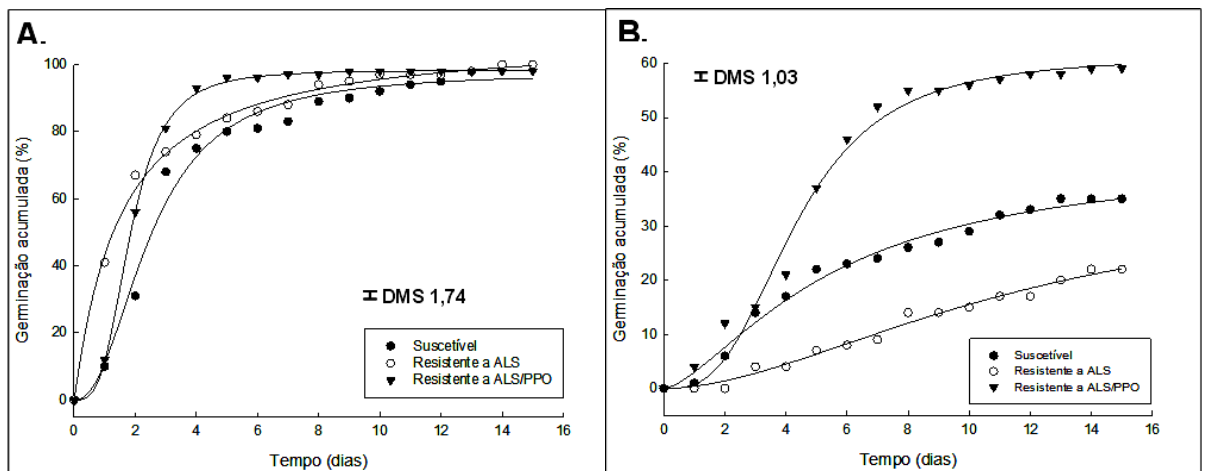


FIGURA 30. Germinação acumulada de sementes com 2 meses de idade (A) e com 12 meses de idade (B) de *E. heterophylla* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX submetidas à temperatura de 32°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.

A análise por meio da distribuição gauseana da média de germinação acumulada dos biótipos aos 12 dias após a germinação de sementes com 2 meses de idade resultou em similaridade de germinação entre os biótipos, pois não diferiram estatisticamente em nenhuma das temperaturas analisadas e resultou na temperatura ótima de germinação em torno de 28°C para todos os biótipos (Figura 31A). Entretanto, a germinação diferiu tanto entre temperaturas quanto dentro da mesma temperatura entre os biótipos com sementes de 12 meses de idade (Figura 31B). Deste modo, fica demonstrado que sementes de *E. heterophylla* com mais de 1 ano de idade apresentam diferentes temperaturas ótimas de germinação em relação aos biótipos resistentes e suscetíveis.

A análise do tempo médio de germinação (MLIT), da velocidade da germinação (TG) bem como da homogeneidade determinada pelo coeficiente de variação de germinação revelou diferenças entre as características de germinabilidade entre temperaturas e entre os biótipos (Tabelas 16 e 17). De forma geral, o tempo médio para ocorrer a germinação foi maior na temperatura mais baixa nas duas idades de sementes. A velocidade de germinação aumentou a medida em que as temperaturas se elevaram e com relação a homogeneidade pode-se observar diferenças em relação ao CVG.

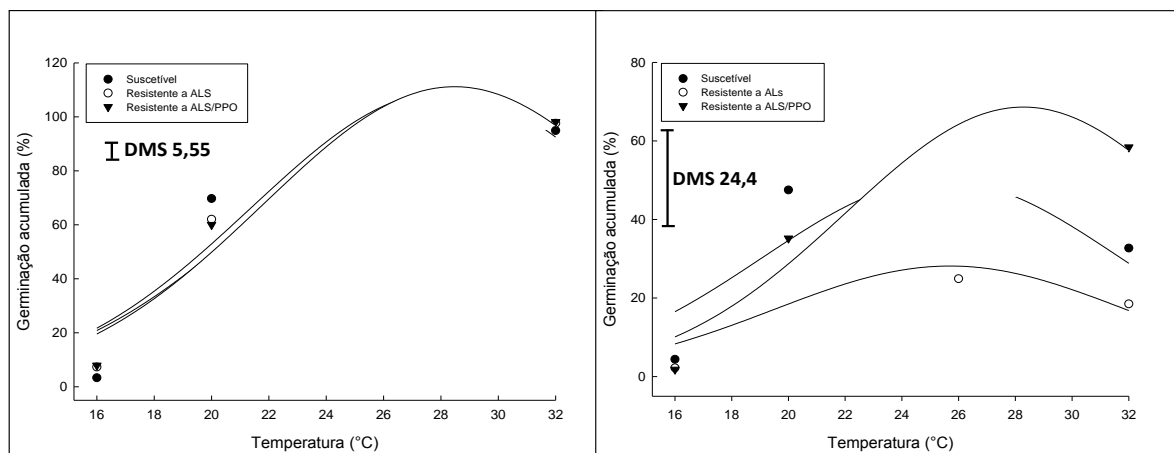


FIGURA 31. Germinação acumulada aos 12 dias após a germinação (DAG) de sementes novas (2 meses) (A) e sementes velhas (12 meses) (B) de *Euphorbia heterophylla* (L.) suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, submetidas as temperaturas de 16, 20, 26 e 32°C. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2011.

TABELA 16. Tempo médio de germinação em dias (MLIT), taxa de germinação (TG) e coeficiente de velocidade de germinação (CVG) de sementes com 2 meses de idade de biótipos de *E. heterophylla* S, R a ALS e R a ALS/PPO, sob diferentes temperaturas. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2011.

Biótipo	Idade	Temperatura (°C)	MLIT (dias)	TG (%)	CVG
S	2	16	8,53	0,50	11,72
R ALS	2	16	10,95	1,11	9,13
R ALS/PPO	2	16	8,60	1,46	11,63
S	2	20	4,59	21,49	21,76
R ALS	2	20	5,51	17,60	18,16
R ALS/PPO	2	20	4,95	14,59	20,20
S	2	26	2,45	45,03	40,83
R ALS	2	26	1,73	69,24	57,65
R ALS/PPO	2	26	2,19	49,95	45,66
S	2	32	4,14	37,74	24,15
R ALS	2	32	3,03	60,48	33,00
R ALS/PPO	2	32	2,59	46,19	38,58

TABELA 17. Tempo médio de germinação em dias (MLIT), taxa de germinação (TG) e coeficiente de velocidade de germinação (CVG) de sementes com 12 meses de idade de biótipos de *E. heterophylla* S, R a ALS e R a ALS/PPO, sob diferentes temperaturas. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2011.

Biótipo	Idade	Temperatura (°C)	MLIT (dias)	TG (%)	CVG
S	12	16	7,95	0,73	12,58
R ALS	12	16	9,00	0,12	11,11
R ALS/PPO	12	16	11,73	0,35	8,52
S	12	20	4,60	12,32	21,72
R ALS	12	20	8,56	3,46	11,69
R ALS/PPO	12	20	7,56	6,69	13,22
S	12	26	4,46	18,93	22,44
R ALS	12	26	7,64	5,25	13,08
R ALS/PPO	12	26	4,52	19,23	22,11
S	12	32	5,74	9,30	17,41
R ALS	12	32	8,14	3,52	12,29
R ALS/PPO	12	32	5,08	16,78	19,67

#### 4.6 Resistência tríplice em *E. heterophylla* (LE6)

Em relação aos experimentos de curvas de dose-resposta sobre o crescimento de plantas para ambas as variáveis, a análise de variância indicou que houve interação significativa entre os biótipos e doses de glifosato ( $p < 0,01$ ). Para todos os biótipos, o controle de plantas daninhas foi diretamente proporcional à taxa de glifosato usado e teve um bom ajuste para a equação logística (Figura 32, Tabela 18). Entretanto, houveram diferenças entre os biótipos.

TABELA 18. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> usadas para determinar a dose de glifosato necessária para reduzir em 50 e 90% o controle ( $C_{50}$  e  $C_{90}$ ) de biótipos de *Euphorbia heterophylla* (L.) suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores de ALS e PROTOX aos 28 dias após o tratamento (DAT). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipo	28 DAT <sup>1</sup>					
	a	b	$Xa_{50}$	$C_{90}$	$R^2$	FR
S	103.0(1.9) <sup>2***3</sup>	-1.4 (0.2) <sup>***</sup>	57.5 (3.0) <sup>***</sup>	234	0,99 <sup>***</sup>	-
R ALS	104.5 (2.5) <sup>***</sup>	-1.6 (0.2) <sup>***</sup>	96.1 (5.8) <sup>***</sup>	309	0,99 <sup>***</sup>	2
R ALS/PPO	101.6 (5.3) <sup>***</sup>	-1.7 (0.3) <sup>**</sup>	162.3 (18.9) <sup>***</sup>	540	0,99 <sup>***</sup>	3

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros  $y=100 - ( a/(1+abs(x/x0)^b)$ );

<sup>2</sup> Valores entre parenteses correspondem ao erro padrão da média.

<sup>3</sup> Sigificância estatística pelo teste 't' a \*5%, \*\*0,1% e \*\*\*0,01% de probabilidade do erro experimental; ns=não significativo.

TABELA 19. Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> usadas para determinar a dose de glifosato necessária para reduzir em 50 e 90% a massa seca da parte aérea (GR<sub>50</sub> e GR<sub>90</sub>) de biótipos de *Euphorbia heterophylla* (L.) suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores de ALS e PROTOX aos 28 dias após o tratamento (DAT). UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

Biótipo	28 DAT <sup>1</sup>					
	a	b	Xa <sub>50</sub>	C90	R <sup>2</sup>	FR
S	98.1(4.5) <sup>2***3</sup>	2.2 (0.3)**	90.2 (7.6)***	240	0,99***	-
R ALS	95.9(2.2)***	3.4 (0.4)***	180.5 (7.0)***	342	0,99***	2
R ALS/PPO	99.4(3.3)***	2.2 (0.3)***	288.7(21.6)***	792	0,99***	3

O efeito das doses de glifosato sobre o biótipo suscetível foi severo e apenas 57 e 234 g ha<sup>-1</sup> foram necessários para o controle de 50 e 90%, respectivamente. As doses de glifosato necessárias para fornecer estes mesmos níveis de controle sobre o biótipo R ALS foram 96 e 309 g ha<sup>-1</sup> respectivamente. Da mesma forma, no biótipo R ALS/PPO, as doses de glifosato necessárias para fornecer estes níveis de controle foram de 540 e 162 g ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 32A, Tabela 18).

Os dados de massa seca da parte aérea para todos os biótipos tiveram um bom ajuste para a equação logística (Figura 32B, Tabela 19). O efeito do herbicida glifosato foi menos pronunciado no biótipo R ALS/PPO do que nos outros dois biótipos. Na verdade, no biótipo R ALS/PPO, as doses do herbicida necessárias para reduzir a massa seca da parte aérea 50 e 90% foram 289 e 792 g ha<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, o biótipo suscetível precisa de apenas um terço dessas doses para ter a redução da massa seca da parte aérea nas mesmas proporções. Em contraste, o biótipo R ALS necessita metade dessas doses (Figura 32B, Tabela 19).

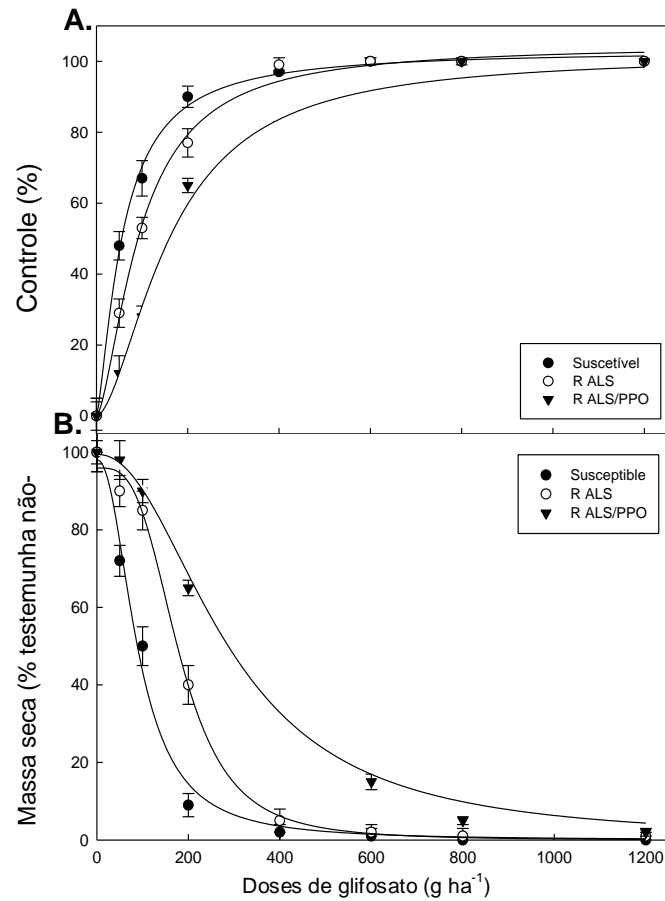


FIGURA 32. Efeito do herbicida glifosato no controle (A) e na massa seca da parte aérea (MSPA) (B) em biótipos de *E. heterophylla* S, R ALS e R ALS/PPO. Porto Alegre-RS, 2012. Dados são as médias  $\pm$  o erro padrão SE (n = 4).

O FR também confirmou as diferenças entre os biótipos, quanto a sensibilidade ao glifosato. Para ambas as variáveis, o FR identificado no biótipo R ALS foi igual a 2 enquanto que no R ALS/PPO o FR foi 3 (Tabelas 18 e 19).

Os experimentos de absorção e translocação utilizando herbicida glifosato radiomarcado foram realizados para verificar se esses processos estão envolvidos na resistência ao glifosato. Entretanto, os resultados tanto de absorção (Figura 33) quanto de translocação (Figura 34), mostraram que a resistência tríplice nesta espécie não está relacionado a estes mecanismos.

No período de 4 HAT mais de 80% do herbicida radiomarcado foi absorvido no biótipo S e para os biótipos resistentes esta mesma quantidade só foi absorvida 24 HAT (Figura 33). Essa diferença só foi observada nos tempos

iniciais de avaliação. Mais de 90% foi absorvido, sem diferenças significativas entre os biótipos, no tempo de 72 HAT (Figura 33). A absorção de  $^{14}\text{C}$ -glifosato, de maneira geral, foi similar entre os biótipos em todos os intervalos de tempo avaliados (exceto na primeiro intervalo avaliado).

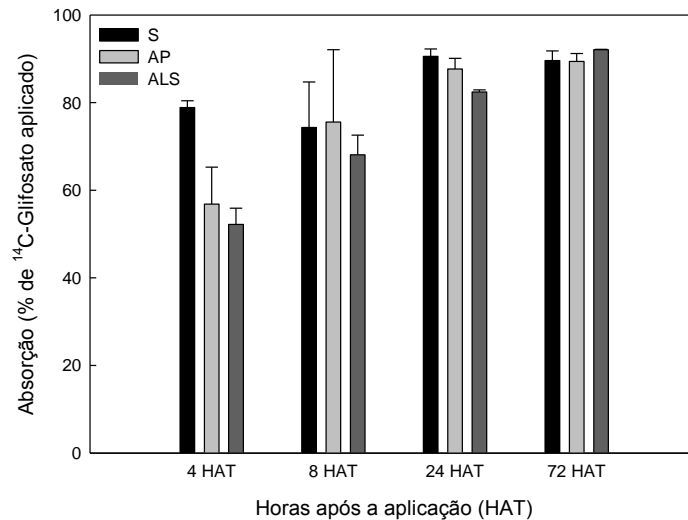


FIGURA 33. Absorção expressa em porcentagem do total de herbicida  $^{14}\text{C}$ -glifosato aplicado em biótipos de *E. heterophylla* S e R aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias  $\pm$  o erro padrão SE (n = 4).

A porcentagem da radioatividade recuperada em diferentes partes da planta indica que um total de 47, 49 e 39% do total da radioatividade absorvida permaneceram na folha tratada ao final do intervalo de tempo estudado nos biótipos S, R ALS/PPO e R ALS, respectivamente (Figura 34A). De maneira geral, em todos os biótipos houve uma redução na quantidade de  $^{14}\text{C}$ -glifosato na folha tratada a medida em que se aumentou o tempo após a aplicação do herbicida (Figura 34A). Diferentemente, para as folhas não tratadas, colmos e raízes a medida em que se aumentou o tempo após a aplicação ocorreu um aumento proporcional na quantidade de  $^{14}\text{C}$ -glifosato detectado (Figura 34B-D). Porém, também não foram observados diferenças entre biótipos.

Maiores quantidades do herbicida marcado translocaram para colmos e raízes sendo pouco detectado em folhas não tratadas. No tempo de avaliação de 72 HAT para o biótipo S 23% do herbicida marcado ficou retido nas raízes enquanto nos biótipos resistentes cerca de 27% ficou concentrada nos colmos (Figura 34C-D). Esses resultados não mostraram diferenças entre o biótipo S e entre os resistentes.

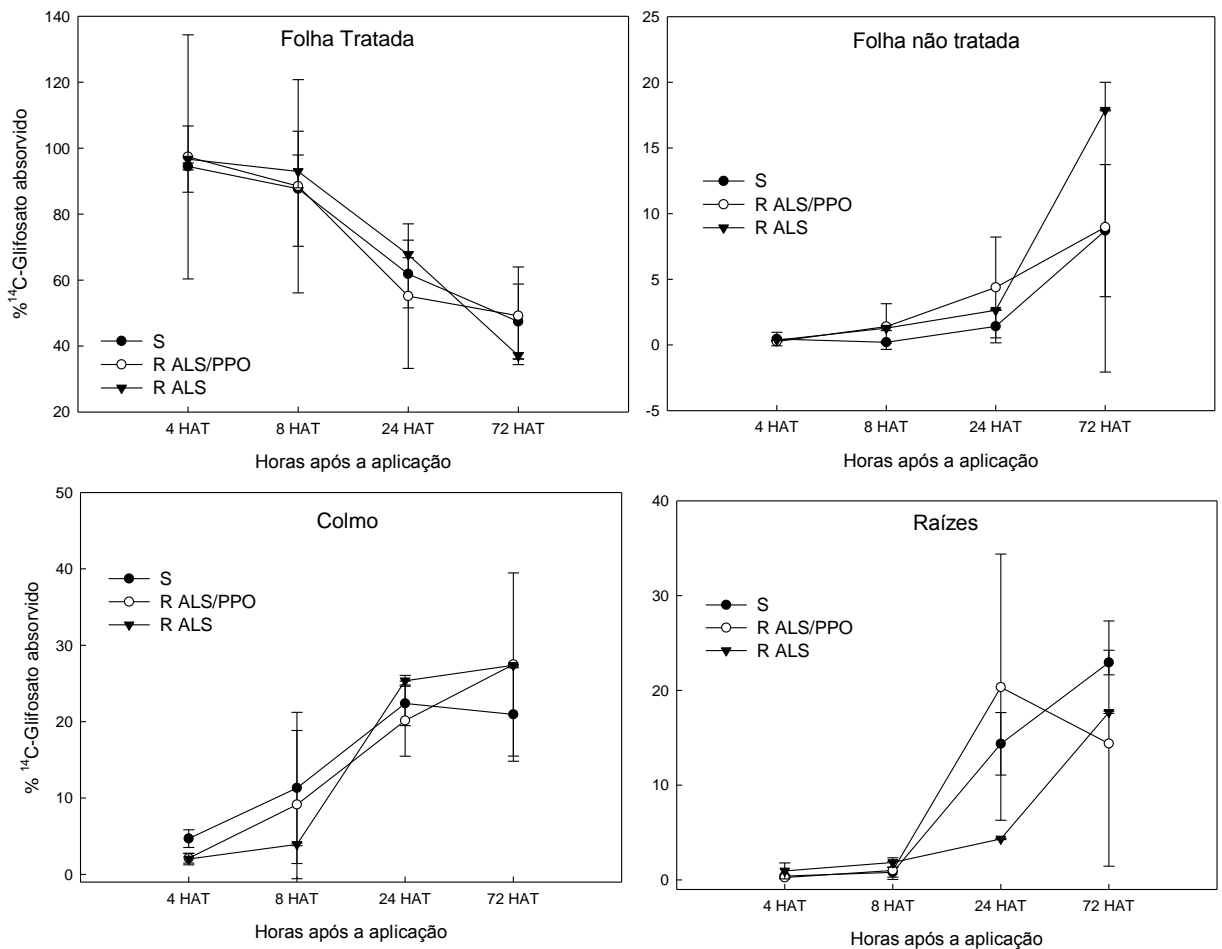


FIGURA 34. Distribuição da porcentagem de  $^{14}\text{C}$ -glifosato absorvido aplicado em diferentes partes da planta em biótipos de *E. heterophylla* S e R aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX. A) Folha tratada; B). Folha não-tratada; C) Colmos; e D) Raízes. Fayetteville-AR, 2013. Dados são as médias  $\pm$  o erro padrão SE (n = 4).



## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho visou ampliar conhecimentos em relação à resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS em biótipos de *E. heterophylla* suscetível, resistente a ALS e com resistência múltipla aos inibidores das enzimas ALS e PROTOX. Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos nas seis linhas de estudo desenvolvidas que enfatizam diferentes aspectos da resistência de aos herbicidas em Euphorbia.

### 5.1 Resistência cruzada aos inibidores da ALS (LE1)

Uma das hipóteses deste trabalho refere-se a ocorrência de resistência a mais de um grupo químico de herbicidas inibidores da ALS. O modo de ação dos herbicidas inibidores da enzima ALS é composto por cinco grupos químicos. Deste modo, hipotetizou-se que tanto o biótipo de *E. heterophylla* resistente à ALS quanto o bitótipo com resistência múltipla a ALS e PROTOX apresentam resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS, ou seja, são resistentes a mais de um grupo químico.

Os biótipos de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da ALS e com resistência múltipla aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX apresentam resistência cruzada. Os resultados obtidos nas curvas de dose-resposta em relação a variável controle confirmam esta hipótese (Tabela 7, Figura 14). Fatores de resistência elevados obtidos a partir dos valores de  $C_{50}$

confirmaram a ocorrência de resistência cruzada aos cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS: imidazolinonas (IMI), sulfoniluréias (SU), pirimidiltiobenzoatos (PTB), triazolopirimidinas (TP) e sulfonil-aminocarbonil-triazolinona (SCT) (Tabela 7).

Os resultados obtidos com a variável MSPA (Tabela 8, Figura 15) e nos ensaios enzimáticos (Tabela 9, Figura 16) corroboram os obtidos com a variável controle. Deste modo, no presente trabalho os biótipos resistentes apresentam resistência cruzada a todos os grupos químicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS.

Os elevados níveis de resistência observados nas curvas de dose-resposta sobre o crescimento de plantas e na atividade enzimática (Tabelas 7-9) foram similares aos resultados obtidos em outras plantas daninhas (LAMEGO *et al.*, 2009b; HAMAUZOVA *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012). Os fatores de resistência (FR) calculados no presente trabalho para os diferentes grupos de herbicidas baseados nos valores de  $C_{50}$ ,  $GR_{50}$  e  $I_{50}$  foram bem maiores dos valores descritos previamente para EPHHL, indicando que esta população tenha evoluído para alto nível de resistência. Os FR observado em biótipos resistentes de EPHHL oriundos do estado do Mato Grosso do Sul (MS) foram >17 para chlorimuron-ethyl e >25 para imazethapyr (GELMINI *et al.*, 2005).

Em geral, os níveis de resistência são dependentes da mutação(s) genética (TRANEL & WRIGHT, 2002). Assim, na literatura, diferentes biótipos da mesma espécie têm mostrado diferentes FR (GELMINI *et al.*, 2005; WHALEY *et al.*, 2007). Assim, é possível atribuir a grande diversidade de resultados observados na literatura a diferentes mutações na enzima ALS.

Em plantas daninhas foram identificadas 8 posições (Ala-122, Ala-205, Pro-197, Asp-376, Arg-377, Ser-653, Gly-654 e Trp-574) que totalizam 24

substituições de aminoácidos identificadas (TRANEL *et al.*, 2011, HAN *et al.*, 2012). Algumas destas mutações identificadas conferem alto nível de resistência aos quatro grupos dos herbicidas inibidores da ALS. A mutação Trp-574-Leu confere alto nível de resistência aos 4 grupos em *Bidens subalternans* (LAMEGO *et al.*, 2009a) e Ala-122-Tyr também causou o mesmo fenótipo em *Raphanus raphanistrum* L. (HAN *et al.*, 2012). A mutação Asp-376-Glu acarretou em resistência cruzada aos quatro grupos em *Conyza canadensis* (HAMAUZOVA *et al.*, 2011).

As diferenças na atividade enzimática entre os biótipos resistentes e suscetível sugerem alterações no local de ação como mecanismo de resistência. Porém, a ocorrência de outro mecanismo de resistência não pode ser descartada para explicar o alto nível de resistência encontrado uma vez que a espécie de estudo apresenta resistência múltipla.

## **5.2 Herança do gene ALS (LE2)**

A segunda linha de estudo desenvolvida neste trabalho teve o objetivo de determinar o tipo de herança, o número de genes que conferem a resistência e o nível de resistência em biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX. A hipótese é de que um gene maior de grande efeito fenotípico com herança nuclear seja responsável pela resistência. Este estudo ocorreu porque até o presente momento a herança aos inibidores da ALS em biótipos com resistência múltipla ainda não tinha sido investigada.

As gerações F1 e F2 dos cruzamentos obtidos entre biótipos suscetível e entre biótipos resistentes aos inibidores da ALS e com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, evidenciaram que a resistência é governada por

um único gene dominante nuclear e com dominância completa (Tabela 12, Figura 17). Resultados semelhantes foram observados por Vargas *et al.* (2001).

O mecanismo de resistência predominante em plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS é local de ação alterado devido a ocorrência de mutações no gene ALS (TRANEL & WRIGHT, 2002). Em EPHHL o mecanismo de resistência ainda não foi elucidado. Porém, a análise fenotípica pode ser um indicativo da mutação presente no biótipo R, pois o padrão de resistência cruzada pode ser definido de acordo com a mutação (TRANEL *et al.*, 2011, HAN *et al.*, 2012). Os biótipos de EPHHL do presente estudo apresentaram resistência cruzada à cinco grupos dos inibidores da ALS (Tabelas 7, Figura 14). Deste modo, fica fortemente sugerida a ocorrência de mutações no gene ALS como mecanismo de resistência nestes biótipos.

Mutações na enzima ALS têm sido observadas como dominantes ou parcialmente dominantes, sendo a herança de gene nuclear (TRANEL & WRIGHT, 2002). Essa predominância de herança de gene nuclear com dominância completa ou parcial pode estar correlacionada ao mecanismo de local de ação alterado, no caso dos inibidores da ALS. Assim, esse fato seria outro fator que evidencia o mecanismo por local de ação alterado nos biótipos do presente estudo. Outras espécies resistentes aos inibidores da ALS apresentaram herança de gene único nuclear com diferentes tipos de dominância, como por exemplo, em *Lactuca* spp. e *Solanum nigrum* (L.) com dominância incompleta (MALLORY-SMITH *et al.*, 1990; VOLENBERG & STOLTENBERG, 2002).

Um único gene nuclear com dominância parcial também controla a resistência a outros modos de ação de herbicidas, como por exemplo, aos inibidores de ACCase na espécie *Solanum ptychanthum* (ASHIGH *et al.*, 2008) e ao herbicida 2,4-D em *Lactuca serriola* (L.) (RIAR *et al.*, 2011). No caso de outros

mecanismos de resistência metabolização (P450), em biótipos de *Lolium rigidum*, a herança é governada por um único gene nuclear dominante (BUSI *et al.*, 2011). No caso de EPHHL com múltipla resistência há a hipótese não testada da ocorrência de um gene envolvido na herança da resistência. A resistência múltipla em *Galium spurium* ao herbicida quinclorac e aos inibidores de ALS é conferida por dois genes distintos sendo um recessivo e o outro dominante, respectivamente (EERD *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a resistência aos inibidores da ALS é governada por um gene nuclear com dominância completa. O tipo de herança encontrado somado ao padrão de resistência cruzada são fortes evidências da ocorrência de mutações no gene ALS. Porém, a ocorrência de outro mecanismo de resistência não pode ser descartada para explicar o alto nível de resistência encontrado uma vez que a espécie de estudo apresenta resistência múltipla.

### **5.3 Citogenética (LE3)**

Os objetivos desta parte do trabalho foram determinar o nível de ploidia em biótipos suscetível e resistentes aos herbicidas, descrever o cariótipo, analisar o comportamento meiótico e quantificar a viabilidade dos grãos de pólen da espécie *E. heterophylla*. Estes objetivos foram baseados na hipótese de que esta espécie possui natureza poliplóide devido a comparação com outras espécies do gênero.

Esse é um trabalho de natureza descritiva das características citogenéticas da espécie *E. heterophylla*. A natureza poliplóide dessa espécie ainda não foi analisada com relação à resistência aos herbicidas, até o presente momento. Os resultados obtidos nos três biótipos de *E. heterophylla* analisados confirmam a poliploidia da espécie (Figura 18).

Outros trabalhos também mostraram que o número cromossômico encontrado em *E. heterophylla* foi  $2n=28$  (SUDA, 2001, AARESTRUP *et al.*, 2008a). No presente trabalho, o número cromossômico observado foi  $2n=28$  independente do biótipo estudado (Figura 18). Não ocorreram diferenças em relação ao nível de plodia entre o biótipo suscetível e os biótipos resistentes.

Outras espécies do gênero *Euphorbia* L. também apresentaram natureza poliplóide (STAHEVITCH *et al.*, 1988; SHEIDAI *et al.*, 2010; WARNER *et al.*, 2011), como por exemplo, a espécie hexaplóide *E. esula* ( $2n=6x=60$ ) com  $x=10$  (STAHEVITCH *et al.*, 1988); a espécie tetraplóide do subgênero *Chamaesyce* Raf. *E. hypericilifolia* ( $2n=4x=32$ ) com  $x=8$ ; a espécie hexaplóide *E. helioscopia* do subgênero *Esula* Pers ( $2n=6x=42$ ) com  $x=7$ ; e duas espécies do subgênero *Poinsettia* (Grah.) House *E. dentata* ( $2n=4x=28$ ) e *E. cyathophora* ( $2n=8x=56$ ) com número básico  $X=7$  (SUDA, 2001). Cabe salientar que *E. heterophylla* L. pertence a este mesmo subgênero em que o  $x=7$ .

Todavia, cerca de 60% das espécies do gênero *Euphorbia* L. são diplóides (STAHEVITCH *et al.*, 1988), como por exemplo, *E. hirta* ( $2n=2X=18$ ) com  $X=9$ ; *E. humifusa* ( $2n=2x=22$ ) com  $X=11$ ; *E. lathyris* e *E. hylonoma* ( $2n=2X=20$ ) com  $X=10$  (WANG, *et al.*, 1999); *E. spinidens*, *E. marschalliana*, *E. bungei*, *E. buhsei* e *E. szovitsii* ( $2n=2x=20$ ) com  $X=10$  e *E. orientalis* ( $2n=2x=18$ ) com  $X=9$  (SHEIDAI *et al.*, 2010). Outra espécie diplóide do gênero recentemente estudada foi *E. palustris* ( $2n=2x=20$ ) (WARNER *et al.*, 2011).

Considerando o número básico de  $x=7$  (SUDA, 2001, AARESTRUP *et al.*, 2008a), pode-se concluir que os biótipos de *E. heterophylla* analisados no presente trabalho são tetraplóides. Os números básicos encontrados no gênero variam de  $x=5$  (0,2%),  $x=6$  (9,1%),  $x=7$  (23,5%),  $x=8$  (16,3%),  $x=9$  (16,6%),  $x=10$  (29,9%),  $x=11$  (2,0%),  $x=13$  (2,2%),  $x=17$  (0,2%) e  $x=19$  (0,5%) (SHARMA *et al.*,

1970). No gênero *Euphorbia* L., a alteração do número de cromossomos tem sido freqüente, onde a poliploidia ocorre em 40,7% das espécies (STAHEVITCH *et al.*, 1988).

A análise do comportamento meiótico revelou que a maior parte das células analisadas apresentavam pareamento cromossômico regular com a presença de associações múltiplas cromossômicas (Figuras 20 e 21). No final a meiose passa a ser normalizada evidenciada pela disjunção regular dos cromossomos (Figura 21) o que poderia explicar a elevada viabilidade de grãos de pólen encontrada.

A viabilidade de pólen foi maior que 94% nos biótipos de *E. heterophylla* estudados (Tabela 14). As diferenças observadas quanto ao grau de maturação das anteras no filamento garantem com que a planta emita pólen viável em diferentes épocas do seu desenvolvimento, caracterizando uma vantagem evolutiva, pois permite aos biótipos resistentes passarem seus genes aos biótipos suscetíveis. Porém, estudos demonstraram que o inverso também pode ocorrer, pois em biótipos resistentes de *Lolium multiflorum* a antese ocorreu de 3 a 5 dias após o suscetível sugerindo a ocorrência de fluxo gênico do suscetível para o resistente (GHERSA *et al.*, 1991).

O estudo da natureza poliplóide de *E. heterophylla* permite entender de forma mais precisa a evolução da resistência bem como os mecanismos envolvidos na herança deste caráter, uma vez que, a mutação responsável pela resistência pode ser encontrada em mais de um alelo (CHRISTOFFERS, 1999). Por exemplo, a espécie daninha tetraplóide resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS, *Bidens subalternans*, mostrou ter pelo menos três alelos para o gene que codifica a enzima (LAMEGO *et al.*, 2009a). Esse fato deve-se a natureza poliplóide desta espécie. A espécie tetraplóide resistente aos herbicidas

sulfoniluréias *Monochoria korsakowii* é um alotetraplóide originado a partir de dois diferentes genomas e a velocidade de dispersão do gene de resistência aos herbicidas de um autotetraplóide é muito mais rápida do que em um alotetraplóide (WANG *et al.*, 2003).

Os biótipos de *E. heterophylla* ( $2n=4X=28$ ) estudados no presente trabalho são tetraplóides não havendo diferenças citogenéticas com a relação a característica resistência aos herbicidas. A análise do cariótipo evidenciou cromossomos muito pequenos inviabilizando a construção do idiograma. O comportamento meiótico regular reflete na elevada viabilidade de grãos de pólen. Isso sugere evento de poliploidização recente devido a presença de irregularidades. A viabilidade de pólen foi maior que 94% e as diferenças quanto à maturação sugerem vantagens evolutivas da espécie.

A informação gerada é de fundamental importância para traçar estratégias que visam elucidar o mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, uma vez que, possivelmente o mecanismo envolva alteração na enzima alvo do herbicida. Dessa forma, mutações específicas podem ocorrer em mais de um alelo do genoma tetraplóide de biótipos com resistência múltipla de *E. heterophylla*.

#### **5.4 Estudos moleculares (LE4)**

Uma das hipóteses deste trabalho é de que o mecanismo de resistência nos biótipos resistentes de *E. heterophylla* com resistência aos herbicidas inibidores da ALS e nos biótipos com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX deve-se a alterações no local de ação da enzima ALS. Isto ocorre pelo fato de que mutações no gene *als* são frequentemente identificadas em plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS (POWLES & YU, 2010; MASSA *et al.*, 2011).



Os resultados obtidos com o presente trabalho não são suficientes para comprovar a hipótese levantada, porque apenas uma pequena porção de 169 pb da sequência nucleotídica do gene *als* foi possível de ser sequenciada nos biótipos resistentes estudados (Figura 26). Deste modo, analisou-se o início da região do gene, denominada de região CAD. Não foram encontradas alterações de aminoácidos entre o biótipo suscetível e os resistentes nestas sequências.

Diversos outros estudos identificaram mutações no gene *als* como responsáveis pela resistência a estes herbicidas (LAMEGO *et al.*, 2009a; MEROTTO *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; LEGERE *et al.*, 2013; MCELROY *et al.*, 2013; PANOZZO *et al.*, 2013). Até o presente momento, não há relatos na literatura de mutações identificadas na espécie *E. heterophylla*.

Em contrapartida, nas espécies *Echinochloa phyllopogon* e *Echinochloa crusgalli* a resistência aos inibidores da enzima ALS não ocorreu devido a TSR, mas sim alterações no metabolismo desta enzima (YASUOR *et al.*, 2009; RIAR *et al.*, 2013). Mecanismos do tipo NTSR não são comuns em plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS.

Pela primeira vez se tem relatos de um pequeno fragmento do gene ALS identificado na espécie *E. heterophylla*. Esse fato é importante pois viabiliza estudos futuros para o isolamento completo do gene ALS nesta espécie. A partir destes resultados será possível desenhar primers direto da sequência nucleotídica de *E. heterophylla*. A região identificada corresponde aos domínios CAD do gene ALS.

### **5.5 Germinabilidade em *E. heterophylla* (LE5)**

Os resultados evidenciaram diferenças no padrão de germinação acumulada entre os biótipos de *E. heterophylla* resistentes e suscetível nas

sementes com 12 meses de idade. Diferenças de germinação em diferentes temperaturas entre biótipos resistentes e suscetíveis aos herbicidas inibidores da enzima ALS também foram encontradas na espécie *Bidens subalternans* (LAMEGO *et al.*, 2011). Biótipos da planta daninha *Solanum ptychanthum* Dun. resistente e suscetível aos inibidores da ALS também diferiram quanto a germinação (ASHIGH & TARDIF, 2011).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos na baixa germinação de sementes de *E. heterophylla* com 12 meses de idade ainda não foram elucidados. Hipotetiza-se que um dos possíveis mecanismos envolvidos seja a dormência. A ocorrência de dormência nesta espécie foi observada através da análise da viabilidade de sementes resistentes e suscetíveis com 14 meses de idade (AARESTRUP *et al.*, 2008b). A dormência desta espécie foi evidenciada através do incremento no índice de velocidade de germinação utilizando técnicas químicas de quebra de dormência (SALVADOR *et al.*, 2007).

A redução de germinação dos biótipos de sementes de 12 meses de idade também pode ser explicada do ponto de vista fisiogenético. Possivelmente haja ocorrência de genes de efeito maior regulando a germinação (LI *et al.*, 2011). A regulação é negativa porque nestes biótipos foi observado menores percentagens de germinação. Porém a elucidação destes genes é complicada pois o processo de germinação é complexo e é controlado por múltiplos genes e por fatores ambientais. A aplicação da biologia molecular possibilitou identificar locus de características quantitativas (QTL) envolvidos em processos de germinação e dormência em plantas modelo como arroz (LI *et al.*, 2011) e em arábida (BENTSINK *et al.*, 2006). O mapeamento destes QTLs revelam a identificação de genes de efeito maior candidatos por serem responsáveis pela germinação (LI *et al.*, 2011).

Outro raciocínio pode ser realizado de forma reversa, ou seja, nas sementes de dois meses de idade podem ser expressos genes que mascaram a expressão dos genes de efeito maior responsáveis pelas baixas germinações em sementes mais velhas, e deste modo ocorre maior germinação. Na genética esse fenômeno, em que genes mascaram a expressão de outros genes, é conhecido como epistasia. Porém, esta hipótese ainda não foi testada.

As sementes dos biótipos resistentes e suscetível de *E. heterophylla* com dois meses de idade diferiram apenas na temperatura mais baixa (16°C). Nas sementes de dois meses de idade, na temperatura de 16°C a partir do 15º dia ocorreu um aumento na germinação do biótipo R ALS corroborando hipótese de que plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS germinam mais sob baixas temperaturas (DYER *et al.*, 1993). Os níveis dos aminoácidos leucina e isoleucina em sementes de *Bidens subalternans* foi 10% maior quando comparado ao suscetível, conferindo deste modo vantagem de germinação do biótipo resistente em baixas temperaturas (DYER *et al.*, 1993; EBERLEIN *et al.*, 1997).

A maior concentração dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina é atribuída a baixa atividade da enzima ALS sob temperaturas mais baixas, sendo desta forma insensível a regulação 'feed back' exercida pelos próprios aminoácidos (EBERLEIN *et al.*, 1997). Consequentemente, o alto nível destes aminoácidos, requeridos para a síntese de DNA, estimulam a divisão celular e aceleram a germinação e o crescimento de plântulas de biótipos resistentes sob baixas temperaturas (EBERLEIN *et al.*, 1999).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo corroboram esta hipótese do mesmo modo do que foi encontrado nas espécies *Bidens subalternans* (DYER *et al.*, 1993; LAMEGO *et al.*, 2011), em *Lactuca serriola* (EBERLEIN *et al.*, 1999) e

em biótipos da planta daninha *Solanum ptychanthum* Dun. (ASHIGH & TARDIF, 2011).

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam que o manejo de leiteira com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX, bem como de biótipos resistentes apenas aos inibidores de ALS deverá ser focado principalmente na eliminação das plantas resistentes que escaparam da aplicação herbicida. Como foi demonstrado, sementes com dois meses após a colheita não apresentam diferenças com relação ao suscetível em temperaturas mais elevadas, condição em que normalmente se desenvolvem as principais culturas que são infestadas por essa daninha. Deste modo, a supressão da aplicação de herbicidas selecionadores das populações resistentes não resultará, em princípio, em aumento da frequência de indivíduos suscetíveis nas áreas.

Conhecendo a amplitude de temperatura em que as sementes de biótipos resistentes de leiteira germinam, auxilia na previsão das regiões mais aptas a evolução da resistência, ou seja, regiões que seriam potencialmente colonizadas por essa espécie, bem como as épocas do ano em que seu estabelecimento teria maior sucesso.

### **5.6 Resistência tríplice em *E. heterophylla* (LE6)**

Os resultados obtidos neste trabalho suportam a hipótese de que biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, também desenvolveram resistência ao herbicida glifosato (Tabelas 18-19, Figura 32). Uma das possíveis razões para isto é que mecanismos de resistência que não envolvem o local de ação alterado tenham sido selecionados com a utilização dos herbicidas utilizados anteriormente na área.

Outros estudos demonstraram que mecanismos do tipo NTSR podem conferir resistência aos herbicidas com diferentes modos de ação. Por exemplo, biótipos de *Alopecurus myosuroides* resistente aos inibidores da ALS e a ACCase (DÉLYE *et al.*, 2011). Também pode ser citado biótipos de *Lolium rigidum* resistentes ao glifosato, ACCase e ALS devido a mecanismos distintos de NTSR como redução na absorção e translocação do herbicida glifosato e aumento na metabolização de ALS e ACCase (YU *et al.*, 2009).

Avaliou-se a hipótese de que a resistência tríplice nesta espécie deve-se a mecanismos que não envolvem o local de ação alterado. A absorção de <sup>14</sup>C-glifosato, com exceção para o primeiro intervalo de tempo estudado, foi similar entre os biótipos. Mais de 90% do herbicida foi absorvido ao final do tempo avaliado sem diferenças entre S e R (Figura 33). Em relação a translocação também não foram observadas diferenças entre os biótipos. Ao final do tempo avaliado cerca de 40% permaneceu na folha tratada, ou seja, mais de 60% do herbicida translocou para os colmos e raízes (Figura 34).

Os resultados de absorção (Figura 33) e de translocação (Figura 34), obtidos no presente trabalho, utilizando o herbicida <sup>14</sup>C-glifosato evidenciaram que a resistência em *E. heterophylla* não é devido a absorção e translocação reduzida. Resultados similares foram encontrados em biótipos resistentes ao glifosato de *Kochia scoparia* onde a absorção e translocação de glifocato não foram suficientes para explicar a resistência nesta espécie (WAITE *et al.*, 2013). Adicionalmente o herbicida glifosato também não afetou a absorção e translocação em biótipos de *Lolium perenne* (L.) (YANNICCARI *et al.*, 2012).

Por outro lado mecanismos que não envolvem o local de ação alterado vêm sendo identificados em plantas daninhas resistentes ao glifosato. Mecanismos de absorção (MICHITE *et al.*, 2007; NANDULA *et al.*, 2008) e de

translocação reduzida (LORRAINE-COLWILL *et al.*, 2003; FENG *et al.*, 2004; WAKELIN *et al.*, 2004; KOGER & REDDY, 2005; MICHITE *et al.*, 2007; DINELLI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008; NANDULA *et al.*, 2008; PRESTON *et al.*, 2009; YU *et al.* 2009) são comumente descritos na literatura como mecanismos responsáveis pela resistência ao herbicida glifosato em diferentes espécies de plantas daninhas.

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho indicam que os biótipos resistentes aos inibidores da ALS bem como os biótipos com resistência múltipla a ALS e PROTOX evoluíram resistência ao herbicida glifosato. O mecanismo responsável por esta resistência não é devido a absorção e translocação reduzida do herbicida.

## 6 CONCLUSÕES

Os biótipos resistentes de *E. heterophylla* estudados apresentam resistência cruzada aos cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS;

O mecanismo de resistência é devido a alterações no local de ação da enzima;

O tipo de herança associado a resistência aos inibidores da enzima ALS nuclear sendo governada por um único gene com dominância parcialmente completa;

A espécie *E. heterophylla* estudada no presente trabalho é uma planta tetraploide com  $2n=28$  cromossomos;

Não foi possível determinar a mutação que confere resistência aos herbicidas inibidores da ALS em *E. heterophylla*, entretanto, pela primeira vez na literatura foi identificado uma sequência do gene *als* incompleta nesta espécie;

Ocorreram diferenças no padrão de germinação acumulada entre os biótipos de *E. heterophylla* resistentes e suscetível nas sementes com 12 meses de idade;

Tanto os biótipos resistentes aos inibidores da ALS bem como os biótipos com resistência múltipla a ALS e PROTOX evoluíram resistência ao herbicida glifosato;

O mecanismo responsável pela resistência ao herbicida glifosato não é devido a absorção e translocação reduzida do herbicida.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, J. R.; KARAM, D.; FERNANDES, G. W. Chromosome number and cytogenetics of *Euphorbia heterophylla* L. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 217-222, 2008a.

AARESTRUP, J. R. et al. Viability analysis of *Euphorbia heterophylla* seeds. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 515-519, 2008b.

ADELUSI, A. A.; ODUFEKO, G. T.; MAKINDE, A. M. Interference of *Euphorbia heterophylla* Linn. on the growth and reproductive yield of soybean (*Glycine max* Linn.) Merrill. **Research Journal of Botany**, New York, v. 1, n. 2, p. 85-94, 2006.

ANDEF - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. Simplificação ou agilização de registros? O que é melhor para o agronegócio brasileiro? **Defesa Agrícola**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 1-4, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.undef.com.br/arquivos/defesa/Defesa5.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

APER, J. et al. The origin of herbicide-resistant *Chenopodium album*: analysis of genetic variation and population structure. **Weed Research**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 235-244, 2010.

ARIAS, D. M.; RIESEBERG, L. H. Gene flow between cultivated and wild sunflowers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 655-660, 1994.

ARRIOLA, P.E.; ELLSTRAND, N. C. Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: persistence of crop genes in wild populations. **Ecological Applications**, Tempe, v. 7, n. 2, p. 512-518, 1997.

ASHIGH, J.; RAJCAN, I.; TARDIF, F. J. Genetics of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors in populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) from Ontario. **Weed Science**, Champaign, v. 56, n. 2, p. 210-215, 2008.

ASHIGH, J.; TARDIF, F. J. Water and temperature stress impact fitness of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicide-resistant populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*). **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 3, p. 341-348, 2011.

BARROSO, G. M. et al. Sistemática de angiospermas do Brasil. In: BARROSO, G. M. et al. (Ed.). **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Editora UFV,

2007. 307 p. v. 1.

BECKIE, H. J.; TARDIF, F. J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, Guildford, v. 35, n. 1, p. 15-28, 2012.

BECKIE, H. J. et al. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, Champaign, v. 14, n. 2, p. 428-445, 2000.

BENTSINK, L. et al. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 103, n. 45, p. 17042-17047, 2006.

BIANCO, S.; PITELLI, R. A.; CARVALHO, L. B. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* (L.) Merr. e *Euphorbia heterophylla* L. **Ensaio e Ciência**, Campo Grande, v. 11, n. 2, p. 61-72, 2007.

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

BRIDGES, D. C.; BRICK, B. J.; BARBAUS, J. C. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Science**, Champaign, v. 40, n. 1, p. 37-42, 1992.

BRIGHENTI, A. M. et al. Análise do crescimento de biótipos de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n. 1, p. 51-59, 2001.

BRUYNS, P. V. Three new species of Euphorbia (Euphorbiaceae) from south tropical Africa. **Novon**, Saint Louis, v. 16, n. 4, p. 454-457, 2006.

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

CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interference of *Euphorbia heterophylla* in the growth and macronutrient accumulation of soybean. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2010.

CHALEFF, R. S.; MAUVAIS, C. J. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. **Science**, Washington, v. 224, n. 4656, p. 1443-1445, 1984.

CHEMALE, V. M.; FLECK, N. G. Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) em competição com *Euphorbia heterophylla* L. sob três densidades e dois períodos de ocorrência. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 5, p. 36-45, 1982.

CHRISTOFFERS, M. J. et al. Target-site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapsis arvensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 54, n. 2, p. 191-197, 2006.

CHRISTOFFERS, M. J. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. **Weed Technology**, Champaign, v. 13, n. 3, p. 647-652, 1999.

CHROSTOFFOLETI, P. J.; FOLONI, L. Dose response-curves of resistant and susceptible *Bidens pilosa* to ALS inhibitor herbicides. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE – WEEDS, 1., 1999, Brighton. **Proceedings of an International Conference**...Brighton: International Conference, 1999. p. 159-162.

COBB, A. H.; READE, J. P. H. Herbicide discovery and development. In: COBB, A. H.; READE, J. P. H. (Ed.). **Herbicides and plant physiology**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 27-49.

COBUCCI, T.; DI STEFANO, J. G.; KLUTHCOUSKI, J. **Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 56 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular técnica, 35).

COLWELL, R. K. et al. Genetic engineering in agriculture. **Science**, Washington, v. 229, n. 4721, p. 111-112, 1985.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamentos da safra de grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 26 abr. 2013.

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

CROOKS, H. L. et al. Vegetative growth and competitiveness of common cocklebur resistant and susceptible to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Cotton Science**, Henan, v. 9, n. 4, p. 229-237, 2005.

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

DELYE, C. et al. Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 433-437, 2011.

DINELLI, G. et al. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 257-265, 2008.

DOORDUIN, L. J. et al. The lack of genetic bottleneck in invasive Tansy ragwort populations suggests multiple source populations. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 11, n. 3, p. 244-250, 2010.

DUGGLEBY, R. G.; McCOURT, J. A.; GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 3, p. 309-324, 2008.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest**

**Management Science**, Sussex, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

DUFF, M. G.; AL-KHATIB, K.; PETERSON, D. E. Relative Competitiveness of Protoporphyrinogen Oxidase-Resistant Common Waterhemp (*Amaranthus rudis*). **Weed Science**, Champaign, v. 57, n. 2, p. 169-174, 2009.

DYER, W. E.; CHEE, P. W.; FAY, P. K. Rapid germination of sulfonylurea resistant *Kochia scoparia* L. accessions is associated with elevated seed levels of branched-chain amino-acids. **Weed Science**, Champaign, v. 41, n. 1, p. 18-22, 1993.

EBERHARDT, D.; NOLDIN, J. **International survey of herbicide resistant weeds - Resistência múltipla em *Sagittaria montevidensis***. Disponível em: <<http://www.weedscience.com/Details/Case.aspx?ResistID=5588>>. Acesso em: 05 maio 2013.

EBERLEIN, C. V. et al. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, Champaign, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1997.

EBERLEIN, C. V. et al. Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. **Weed Science**, Champaign, v. 47, n. 1, p. 383-392, 1999.

EERD, L. L. V. et al. Resistance to quinclorac and ALS-inhibitor herbicides in *Galium spurium* is conferred by two distinct genes. **Weed Research**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 355-365, 2004.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2004**. Londrina, 2003. 237 p. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION. **EPPO Plant Protection Thesaurus (EPPT)**. Disponível em: <<http://eppt.eppo.org/view.php?bcode=EPHHL>>. Acesso em: 19 maio 2013.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Weed species in crops and countries - *Euphorbia heterophylla* (L.)**. Disponível em: <[http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/biodiversity/weeds/listweeds/eup\\_het/en/](http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/biodiversity/weeds/listweeds/eup_het/en/)>. Acesso em: 11 maio 2013.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 11 maio 2013.

FENG, P. C. C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 4, p. 498-505, 2004.

FERREIRA, E. A. et al. Glyphosate translocation in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 637-643, 2008.

FOES, M. J., et al. A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 46, n. 5, p. 514-520, 1998.

FRIGO, M. J. et al. Esterase polymorphism for analysis of genetic diversity and structure of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) populations. **Weed Science**, Champaign, v. 57, n. 1, p. 54-60, 2009.

GAINES, T. A. et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 16, n. 2, p. 117-125, 1998.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Resistência da planta daninha capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 18, n. 1, p. 169-180, 2000.

GEALY, D. R.; MITTEN, D. H.; RUTGER, J. N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): implications for weed management. **Weed Technology**, Champaign, v. 17, n. 3, p. 627-645, 2003.

GELMINI, G. A. et al. Resistance of *Euphorbia heterophylla* L. to ALS-inhibiting herbicides in soybean. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 452-457, 2005.

GERWICK, B. C.; SUBRAMANIAN, M. V.; LONEY-GALLANT, V. I. Mechanism of action of the 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidines. **Pesticide Science**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 357-364, 1990.

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

GHERSA, C. M. et al. Fitness studies of *Italian ryegrass* resistant to diclofop-methyl: 2. Pollen phenology and gene flow. In: THE WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE, 44., 1991, Seattle, Washington. **Proceedings...** Newark: WSWWS Business Manager, 1991. p. 42.

GILL, G. S.; CONSENS, R. D.; ALLAN, M. R. Germination, growth, and development of herbicide resistant and susceptible populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 252-256, 1996.

GOULART, I. C. G. R.; MATZENBACHER, F. O.; MEROTTO, A., JR. Differential germination pattern of rice cultivars resistant to imidazolinone herbicides carrying different acetolactate synthase gene mutations. **Weed Research**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 224-232, 2012.

GRANT, V. Plant speciation. In: GRANT, V. (Ed.). **Plant speciation**. New York: Columbia University Press, 1971. p. 435.

HALL, L. M.; STROME, K. M.; HORSMAN, G. P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, Champaign, v. 46, n. 4, p. 390-396, 1998.

HAMOZOVA, K. et al. Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 113-122, 2011.

HAN, H. P. et al. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 8, p. 1164-1170, 2012.

HANS, A. S. Chromosomal conspectus of the Euphorbiaceae. **Taxon**, Utrecht, v. 22, n. 5/6, p. 591-636, 1973.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 28 abr. 2013.

HILTON, H. W. Herbicide tolerant strains of weeds. **Hawaiian Sugar Planters Association Annual Reports**, Honolulu, v. 69, 1957.

HOLT, J. S.; RADOSEVICH, S. R. Differential growth of two common groundsel (*Senecio vulgaris*) biotypes. **Weed Science**, Champaign, v. 31, n. 2, p. 112-120, 1983.

HOVAV, R. et al. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 16, p. 6191-6195, 2008.

INGROUILLE, M. Diversity and evolution of land plants. In: INGROUILLE, M. (Ed.). **Diversity and evolution of land plants**. London: Springer, 1992. 340 p.

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

KARAM, D. et al. Estudo da interferência das plantas daninhas com a cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS DANINHAS, 19., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: SBCPD, 1993. p. 32-33.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. In: KISSMANN, K. G.; GROTH, D. (Ed.). **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. 798 p. v. 2.

KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 1, p. 84-89, 2005.

KRUGER, G. R. et al. Frequency, distribution, and characterization of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes with resistance to glyphosate and ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 57, n. 6, p. 652-659, 2009.

LAMEGO, F. P. **Elucidação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS na espécie poliplóide *Bidens subalternans* DC.** 2008. 152 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LAMEGO, F. P. et al. Molecular basis of resistance to ALS-Inhibitor herbicides in greater beggarticks. **Weed Science**, Champaign, v. 57, n. 5, p. 474-481, 2009a.

LAMEGO, F. P. et al. Cross-resistance of *Bidens subalternans* to acetolactate synthase inhibitors in Brazil. **Weed Research**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 634-641, 2009b.

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

LANDE, R. The response to selection on major and minor mutations affecting a metrical trait. **Heredity**, London, v. 50, n. 1, p. 47-65, 1983.

LEGERE, A. et al. Growth Characterization of kochia (*Kochia scoparia*) with substitutions at Pro(197) or Trp(574) conferring resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 61, n. 2, p. 267-276, 2013.

LEGLEITER, T. R.; BRADLEY, K. W. Glyphosate and multiple herbicide resistance in common waterhemp (*Amaranthus rudis*) populations from Missouri. **Weed Science**, Champaign, v. 56, n. 4, p. 582-587, 2008.

LERMONTOVA, I. et al. Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 16, p. 8895-8900, 1997.

LEWIS, W. H. Polyploidy in angiosperms: dicotyledons. In: LEWIS, W. H. (Ed.). **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum Press, 1980a. p. 241-268.

LEWIS, W. H. Polyploidy in species populations. In: LEWIS, W. H. (Ed.). **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum Press, 1980b. p. 103-144.

LI, M. et al. Identification of quantitative trait loci associated with germination using chromosome segment substitution lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 123, n. 3, p. 411-420, 2011.

LI, M. et al. ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, n. 6, p. 689-695, 2012.

LORENZI, H. *Euphorbia heterophylla* (L.) In: LORENZI, H. (Ed.). **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. p. 174-175.

LORRAINE-COLWILL, D. F. et al. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry & Physiology**, San Diego, v. 74, n. 2, p. 62-72, 2003.

MABBERLEY, D.J. *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. In: MABBERLEY, D. J. (Ed.). **Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 1021 p.

MALIK, M. S.; BURGOS, N. R.; TALBERT, R. E. Confirmation and control of propanil-resistant and quinclorac-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in rice. **Weed Technology**, Champaign, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2010.

MALLORY-SMITH, C. A.; HENDRICKSON, P.; MUELLER-WARRANT, G. W. Identification of herbicide resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, Champaign, v. 4, n. 1, p. 163-168, 1990.

MASSA, D.; KRENZ, B.; GERHARDS, R. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spec-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 294-303, 2011.

MASSINGA, R. A. et al. Relative fitness of imazamox-resistant common sunflower and prairie sunflower. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 2, p. 166-174, 2005.

MAXWELL, B. D.; ROUSH, M. L.; RADOSEVICH, J. R. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. **Weed Technology**, Champaign, v. 4, n. 1, p. 2-13, 1990.

MAZUR, B. J.; CHUI, C. F.; SMITH, J. K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 4, p. 1110-1117, 1987.

McCLOSKEY, W. B.; HOLT, J. S. Triazine resistance in *Senecio vulgaris* parental and nearly isonuclear backcrossed biotypes is correlated with reduced productivity. **Plant Physiology**, Washington, v. 92, n. 4, p. 954-962, 1990.

McDOUGALL, P. The global agrochemical and seed markets: industry prospects. In: CPDA ANNUAL MEETING, 2008, San Francisco. **CPDA presentation**. San Francisco, 2008. Disponível em: <<http://cpda.kma.net/index.asp?bid=151>>. Acesso em: 12 maio 2013.

McELROY, J. S. et al. A Trp(574) to Leu amino acid substitution in the ALS gene of annual bluegrass (*Poa annua*) is associated with resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 61, n. 1, p. 21-25, 2013.

McNAUGHTON, K.E. et al. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 1, p. 17-22, 2005.

MENEGATTI, A. L. A.; BARROS, A. L. M. Análise comparativa dos custos de produção entre soja transgênica e convencional: um estudo de caso para o



Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 163-183, 2007.

MEROTTO JR., A. et al. Cross-resistance to herbicides of five ALS-Inhibiting Groups and Sequencing of the *als* gene in *Cyperus difformis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 4, p. 1389-1398, 2009.

MEROTTO JR., A.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R. A.; MEROTO JR., A. (Ed.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 69-86 p.

MERREL, D. J. Ecological genetics. In: MERREL, D. J. (Ed.). **Ecological genetics**. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1981. 500 p.

MEYER, D. E.; CEDERBERG, C. **Pesticide use and glyphosate-resistant weeds - a case study of Brazilian soybean production**. 2010. (SIK-Rapport, 809). Disponível em: <<http://www.sik.se/archive/pdf-filer-katalog/SR809.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2013.

MICHITTE, P. et al. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, Champaing, v. 55, n. 5, p. 435-440, 2007.

MOQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato synthase. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n. 1, p. 67-73, 2001.

MONQUERO, P. et al. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MORTIMER, A. M. **Review of graminicide resistance, 1998**. Disponível em: <<http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm>, 32p.>. Acesso em: 03 maio 2013.

MUNTZING, A. The evolutionary significance of autopolyploidy. **Hereditas**, Lund, v. 21, n. 2, p. 263-378, 1936.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NANDULA, V. K. et al. Glyphosate tolerance mechanism in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaing, v. 56, n. 3, p. 344-349, 2008.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production - losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 4, p. 275-285, 2004.

OWEN, M. D. K. Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 4, p. 377-387, 2008.

PANOZZO, S. et al. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 105, n. 2, p. 93-101, 2013.

PATERSON, A. H. et al. The weediness of wild plants: molecular analysis of genes influencing dispersal and persistence of johnsongrass, *Sorghum halepense* (L.) Pers. **Proceedings National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 13, p. 6127-6131, 1995.

PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J.; HAGER, A. G. A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype with multiple resistance across three herbicide sites of action. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 1, p. 30-36, 2005.

PARK, K. W.; MALLORY-SMITH, C. A. Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. **Weed Research**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 71-77, 2004.

PONCHIO, J. A. R. **Resistência de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase**. 1997. 139 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. **Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants, 1998**. Disponível em: <<http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/mono2.htm>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

POWLES, S. B.; SHANER, D. L. Herbicide resistance and world grains. In: POWLES, S. B.; SHANER, D. L. (Ed.). **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 308 p.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

PRESTON, C.; MALLORY-SMITH, C. A. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. In: POWLES, S. B.; SHANER, D. L. (Ed.). **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 24-49.

PRESTON, C. et al. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactato synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, n. 3, p. 227-235, 2006.

PRESTON, C. et al. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: Mechanisms, Genes, Fitness, and Agronomic Management. **Weed Science**, Champaign, v. 57, n. 4, p. 435-441, 2009.

RADCLIFFE-SMITH, A.; ESSER, H. J. Genera euphorbiacearum. In: RADCLIFFE-SMITH, A.; ESSER, H. J. (Ed.). **Genera euphorbiacearum**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001. 464 p.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

RIAR, D. S. et al. Inheritance and physiological basis for 2,4-D resistance in prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 17, p. 9417-9423, 2011.

RIAR, D. S. et al. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 2, p. 278-289, 2013.

RITZ, C.; STREIBIG, J. E. Bioassays using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 12, n. 5, p. 1-22, 2005.

RIZZARDI, M. A. et al. Interferência de populações de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea ramosissima* isoladas ou em misturas sobre a cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 1, p. 29-34, 2004.

RIZZARDI, M.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Nível crítico de dano (NCD) de infestantes na cultura da soja. In: VIDAL, R. A.; PORTUGAL, J.; SKORA NETO, F. (Ed.). **Nível crítico de dano de infestantes em culturas anuais**. Porto Alegre: Evangraf, 2010. p. 45-56.

ROSO, A. C. et al. Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 175-182, 2010.

ROSO, A. C.; VIDAL, R. A. A modified phosphate-carrier protein theory is proposed as a non-target site mechanism for glyphosate resistance in weeds. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, p.1175-1185, 2010. Número especial.

ROSO, A. C.; VIDAL, R. A. Culturas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS: revisão de literatura. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 13-24, 2011.

RYAN, G. F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. **Weed Science**, Champaign, v. 18, n. 5, p. 614-616, 1970.

SALMON, A.; AINOUCHE, M. L. Polyploidy and DNA methylation: new tools available. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 213-215, 2010.

SALVADOR, F. L. et al. Effect of light and dormancy break on weed species seed germination. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 303-308, 2007.

SANTEL, H. J. et al. Flucarbazone-sodium: a new herbicide for grass control in wheat. **Weed Science Society of America Abstracts**, Champaign, v. 39, n.1, p. 7, 1999.

SAS - Institute Statistical Analysis System. **User's guide**: version 6.4. Cary: SAS Institute, 2008. 76 p.

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

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

SEEFELDT, S. S. et al. Production of herbicide-resistant jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) and wheat (*Triticum aestivum*) hybrids in the field by natural hybridization. **Weed Science**, Champaign, v. 46, n. 6, p. 632-634, 1998.

SENG, C. T. et al. Initial report of glufosinate and paraquat multiple resistance that evolved in a biotype of goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia. **Weed Biology and Management**, Okayama, v. 10, n. 4, p. 229-233, 2011.

SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. Imidazolinones: potential inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, Washington, v. 76, n. 2, p. 545-546, 1984.

SHANER, D. L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection and management. **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 3, p. 405-411, 1999.

SHARMA, A. K. Annual report 1967-68. **Research Bulletin of University of Calcutta**, Calcutta, v. 2, n. 1, p. 1-50, 1970.

SHEIDAI, M.; GHAZEI, M.; PAKRAVAN, M. Contribution to cytology of the genus euphorbia in Iran. **Cytologia**, Tokyo, v. 75, n. 4, p. 477-482, 2010.

SHIVRAIN, S. V. et al. Gene flow between Clearfield™ rice and red rice. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 3, p. 349-356, 2007.

SHOUP, D. E. et al. Common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 51, n. 2, p. 145-150, 2003.

SILVA, A. F. et al. Período anterior à interferência na cultura da soja-RR em condições de baixa, média e alta infestação. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2009.

SOSNOSKIE, L. M. et al. Multiple resistance in *Palmer amaranth* to glyphosate and pyriithiobac confirmed in Georgia. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 3, p. 321-325, 2011.

SOYSTAT – STATISTICS IN SOYBEAN CROP. **World soybean production**. Disponível em: <<http://www.soystats.com/2012/Default-frames.htm>>. Acesso em: 05 mar. 2013.

STAHEVITCH, A. E.; CROMPTON, C. W.; WOJTAS, W. A. The biology of canadian weeds *Euphorbia cyparissias* L. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 68, n. 1, p. 175-191, 1988.

STIDHAM, M. A. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. **Weed Science**, Champaign, v. 39, n. 4, p. 428-434, 1991.

STREIBIG, J. C.; RUDEMO, M.; JENSEN, J. E. Dose response curves and statistical models. In: KUDSK, P.; STREIBIG, J. E. (Ed.). **Herbicide bioassays**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 29-55.

SUDA, C. N. K. **Hidrolases da parede celular em sementes de *Euphorbia heterophylla* L. durante a germinação e desenvolvimento inicial da plântula**. 2001. 144 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia, USP, Ribeirão Preto, 2001.

SWITZER, C. M. The existence of 2,4-D resistant wild carrot. **Procedures of Northeastern Weed Control Conference**, Oshkosh, v. 9, n. 1, p. 75-77, 1952.

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

TAN, S. et al. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.

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

TARDIF, F. J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powelli*. **New Phytologist**, Oxon, v. 169, n. 2, p. 251-264, 2006.

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

TRANDEL, P. J. et al. Herbicide Resistances in *Amaranthus tuberculatus*: A Call for New Options. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 11, p. 5808-5812, 2011.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Crescimento estival de três biótipos de leiteira resistentes e um suscetível aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 255-260, 2000.

TREZZI, M. M. et al. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, Virginia, v. 40, n. 1, p. 101-109, 2005.

TREZZI, M. M. et al. Bioensaios para identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 563-571, 2006.

TREZZI, M. M. et al. Local de absorção de fomesafen como mecanismo de resistência em biótipo de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores da PROTOX. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 139-148, 2009.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Técnica de cruzamentos controlados em *Euphorbia heterophylla* L. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 23-27, 1999.

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

VARGAS, L. et al. Resistência de plantas daninhas à herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Ed.). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Gráfica Berthier, 2009. p. 9-11.

VAUGHN, K. C. Herbicide resistance work in the United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 6-7, p. 764-769, 2003.

VENCILL, W. K. et al. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, Champaign, v. 60, p. 2-30, 2012. Special issue.

VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A. Herbicidas inibidores da ALS. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A. (Ed.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p. 25-36.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Desenvolvimento comparativo entre biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*). **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 5, n. 1, p. 122-126, 1999.

VIDAL, R. A. et al. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* (L.)) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 5, n. 2, p. 265-269, 2007.

VIDAL, R. A.; PORTUGAL, J.; SKORA NETO, F. Nível crítico de dano de infestantes em culturas anuais. In: VIDAL, R. A.; PORTUGAL, J.; SKORA NETO, F. (Ed.). **Nível crítico de dano de infestantes em culturas anuais**. Porto Alegre: EVANGRAF, 2010. 132 p.

VOLENBERG, D. S.; STOLTENBERG, D. E. Inheritance of resistance in eastern black nightshade (*Solanum nigrum*) to acetolactate synthase inhibitors. **Weed Science**, Champaign, v. 50, n. 6, p. 731-736, 2002.

WAITE, J. et al. Differential *Kochia* (*Kochia scoparia*) populations response to glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 61, n. 2, p. 193-200, 2013.

WAKELIN, A. M.; PRESTON, C. A target site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 432-440, 2006.

WANG, GX. et al. Inheritance of sulfonylurea resistance in a paddy weed, *Monochoria korsakowii*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 28, n. 2, p. 212-214, 2003.

WARNER, C. et al. Biological Flora of Central Europe: *Euphorbia palustris* L. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, Jena, v. 13, n. 1, p. 55-69, 2011.

WARWICK, S. I. Herbicide resistance in weedy plants: physiology and population biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, n. 1, p. 95-114, 1991.

WHALEY, C. M.; WILSON, H. P.; WESTWOOD, J. H. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 55, n. 2, p. 83-90, 2007.

WHITEHEAD, C. W.; SWITZER, C. M. The differential response of strains of wild carrot to 2,4-D and related herbicides. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 255-262, 1967.

WILLARD, T. S., GRIFFIN, J. L. Soybean (*Glycine max*) yield and quality by responses associated with Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, Champaign, v. 7, n. 1, p. 118-122, 1993.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, J. F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 70, n. 4, p. 21- 24, 2002.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, J. F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.

WOOD, T. E. et al. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 33, p. 13875-13879, 2009.

YANG, X. H. et al. Genomic aspects of research involving polyploid plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht , v. 104, n. 3, p. 387-397, 2011.

YANNICCARI, M. et al. Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 82, n. 1, p. 14-19, 2012.

YASUOR, H. et al. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 9, p. 3653-3660, 2009.

YU, Q. et al. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science**, Champaign, v. 51, n. 6, p. 831-838, 2003.

YU, Q. et al. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta**, Berlin, v. 225, n. 2, p. 499-513, 2007.

YU, Q. et al. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 4, p. 713-723, 2009.

ZHANG, W. Q. et al. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clearfield rice to red rice (*Oryza sativa*). **Euphytica**, Wageningen, v. 152, n. 1, p. 75-86, 2006.



## **8 VITA**

Ana Carolina Roso é filha de Sergio Luís Roso e Neiva Regina Roso. Nasceu em Porto Alegre-RS, em 02 de dezembro de 1982. No ano de 2002 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR, onde obteve o título de Engenheira Agrônoma em fevereiro de 2007. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Obteve o título de mestre em Fitotecnia em 2009 e no mesmo ano ingressou no curso de doutorado pelo mesmo programa. No período de 2012 à 2013 realizou doutorado sanduíche na University of Arkansas, Fayetteville-AR, USA, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).