

ABSORÇÃO DIFERENCIAL DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA PROTOX COMO PROVÁVEL CAUSA DA RESISTÊNCIA EM BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L.

Rafael Pedroso Silva¹, Michelangelo Muzell Trezzi, Mara Stoco Gustamann, Edson Franchin & Anderson Luis Nunes

1-Estudante de Graduação do curso de agronomia (4º ano); estagiário da área de plantas daninhas;

Resumo - dois experimentos em casa de vegetação foram conduzidos com o objetivo de determinar se a absorção diferencial de herbicidas inibidores da enzima PROTOX em diferentes estruturas das plantas de *E. heterophylla* (EPHHL) é a causa provável da resistência a herbicidas inibidores da enzima PROTOX. Em casa de vegetação, as plantas de EPHHL dos biótipos suscetível (S) e resistente (R) a inibidores da enzima PROTOX (R), foram aspergidas com diferentes doses do herbicida fomesafen em pré e pós-emergência. Curvas de dose resposta foram ajustadas, utilizando o modelo logístico. A injúria foi maior para o biótipo S em todas as avaliações visuais, tanto em pré-emergência quanto em pós-emergência, no entanto as diferenças de injúria entre os dois biótipos foi superior na aplicação de fomesafen em pós-emergência, em relação à aplicação em pré. Para a variável matéria verde (MV), os biótipos não diferiram entre si na aplicação em pré-emergência, no entanto, na aplicação em pós-emergência, houve redução de 51% da matéria verde para o biótipo S e de apenas 22% no biótipo R a inibidores da enzima PROTOX. Os resultados de injúria e MV confirmam a suspeita de que a menor absorção do herbicida fomesafen pelo biótipo de EPHHL R a inibidores da enzima PROTOX possa ser a provável causa para a resistência.

Palavras-Chave: leiteira, fomesafen, mecanismo de resistência.

DIFFERENTIAL ABSORPTION OF INHIBITING HERBICIDES OF THE PROTOPORPHYRINOGEN OXYDASE ENZYME AS PROBABLE CAUSE OF RESISTANCE IN *Euphorbia heterophylla* L. BIOTYPES

Abstract- two experiments were developed under greenhouse with the objective to determine if the differential absorption of inhibiting herbicides of the PROTOX enzyme in different structures of plants of *Euphorbya heterophylla* (EPHHL) is the probable cause of resistance to the inhibiting herbicides of PROTOX enzyme. In greenhouse the plants of susceptible (S) and resistant (R) biotypes of EPHHL resistant to PROTOX enzyme, were sprayed using different levels of fomesafen for the treatments in pre and post-emergency. Dose-response relationship were adjusted using logistic models. In greenhouse the injury was bigger for S biotype in all visual evaluations, both in pre and post-emergency, but the differences of injury between S and R were superior in post-emergency than in pre-emergency treatments. Green matter (GM) of EPHHL biotypes didn t differe at pre-emergency applications, but at post-emergency treatments the GM of S biotype did reduce 51% while the GM of R biotype did reduce 22% in relation to the test without fomesafen. The results of injury and GM confirm that the lesser absorption of the herbicida fomesafen in R biotype could be the probable cause for the resistance to the PROTOX enzyme inhibitors.

KeyWord: wild-spurge, fomesafen, resistance mechanism

1. INTRODUÇÃO

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que

normalmente seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie.

O surgimento de plantas daninhas resistentes, no Brasil, tem como causa mais provável o uso repetido de herbicidas. A resistência aos herbicidas assume maior importância a partir do momento em que o número de

ingredientes ativos disponíveis no mercado para controle de determinadas espécies é bastante restrito. Os biótipos resistentes não respondem mais a aplicações de produtos aos quais adquiriram resistência, muitas vezes mesmo quando estes são usados em altas doses.

O aparecimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas é recente, apesar dos herbicidas serem usados há mais de 40 anos. Os registros apontam atualmente a existência de 315 biótipos resistentes em 280.000 locais do mundo, distribuídos entre 183 espécies (110 dicotiledôneas e 73 monocotiledôneas) (Heap, 2007).

Recentemente, em 2004, em áreas cultivadas com soja localizadas na região Sudoeste do Paraná, foram identificados dois biótipos de EPHHL que não respondiam à aplicação das doses recomendadas dos herbicidas imazethapyr (inibidor da ALS) e fomesafen (inibidor da enzima PROTOX) para o controle dessa espécie (Trezzi et al., 2005). Nestes casos, observou-se que os inibidores da enzima PROTOX aplicados em pré-emergência das plantas apresentaram bom controle, enquanto os inibidores da PROTOX aplicados em pós-emergência não controlaram as plantas de EPHHL (Trezzi et al., 2005).

Vários são os fatores que conferem resistência às plantas daninhas, podendo ser eles fatores genéticos, fatores bioecológicos e fatores agrônômicos. Dentre esses fatores, os que dizem respeito aos fatores agrônômicos, estão ligados ao uso repetitivo de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação. Neste caso, a resistência pode ser induzida a mecanismos relacionados à absorção, translocação e metabolização.

A base da seletividade de herbicidas inibidores da enzima PROTOX em espécies tolerantes pode ser atribuída à absorção e translocação mínimas de herbicida, seqüestro de herbicida, ou concentração aumentada da enzima PROTOX mitocondrial que serve como um redutor para o excesso de protoporfirinogen no citoplasma (Higgins et al., 1988; Matsumoto et al., 1999; Warabi et al., 2001).

Herbicidas inibidores da protoporfirinogen oxidase (enzima PROTOX) tem um longo percurso de absorção entre diferentes espécies de plantas, mas a translocação geralmente é limitada (Higgins et al., 1998; Ritter and Coble, 1981; Unland et al., 1999; Vanstone and Stobbe, 1978). Contudo, pequenas diferenças na absorção e translocação poderão ocorrer entre plantas, podendo explicar as diferenças de tolerância aos herbicidas inibidores da enzima PROTOX (Ritter & Coble, 1981). A maior tolerância de soja ao herbicida difeniléter acifluorfen foi devida à menor rapidez de absorção, translocação e metabolização dos herbicidas (Ritter & Coble, 1981).

Sugere-se que a absorção diferencial seja a provável causa para a indução da resistência em EPHHL. Considerando-se isso, o objetivo desse trabalho foi determinar se a absorção diferencial de inibidor da enzima PROTOX em diferentes estruturas das plantas de *E. heterophylla* L. é a causa provável da resistência a herbicidas inibidores da enzima PROTOX;

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os dois experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, arranjado em um fatorial 2x7, com quatro repetições.

Os experimentos foram implantados em 20 de dezembro de 2006. No primeiro experimento, o herbicida fomesafen foi aplicado em pré emergência. O primeiro fator foi constituído pelos biótipos de EPHHL utilizados R e S (Resistente e Suscetível); e o segundo fator os níveis de fomesafen (0, 120, 240, 480, 960, 1920 e 3840 g ha⁻¹). No segundo experimento, o herbicida foi aplicado em pós emergência. O primeiro fator foram os biótipos de EPHHL utilizados (R e S) e o segundo fator os níveis de fomesafen (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 g ha⁻¹).

A coleta de solo para os experimentos foi realizada na área experimental da UTFPR, localizada a 3 Km de distância do Campus Sudoeste. Após a coleta, o solo foi homogeneizado, peneirado com peneira de malha 3 mm, de forma a se obter quantidade suficiente para realização do experimento. O solo foi depositado em vasos com capacidade para 1000 cm³, e a aspersão dos herbicidas feita com pulverizador manual pressurizado a CO₂, tendo a barra de aspersão três bicos do tipo leque com vazão de 200 L ha⁻¹.

Nestes experimentos, foram depositadas 15 sementes em cada vaso. No experimento em pós-emergência, a população emergida foi desbastada para cinco plantas por vaso. No experimento em pré-emergência, os herbicidas foram aspergidos logo após a semeadura sobre o solo. No experimento em pós-emergência, aspergiu-se fomesafen no momento em que as plantas de EPHHL estavam no estágio denominado estrelinha (2 folhas cotiledonares e 2 folhas verdadeiras).

Para esses experimentos, foram determinados: os níveis de injúria às plantas de EPHHL aos 14 e 21 dias após a aplicação do herbicida (DAA), através da utilização de escala percentual, em que 0% representa ausência de sintomas e 100% a morte total das plantas; e a matéria verde (MV) das plantas de EPHHL aos 21 DAA.

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F. A relação entre análise visual e matéria verde (MV) com os níveis de herbicidas foi ajustada pelo modelo logístico de quatro parâmetros, utilizando-se o programa computacional Sigmaplot:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + (x/c)^b}$$

O procedimento adotado pelo programa estima, por sucessivas interações, os valores dos parâmetros nos quais a soma dos quadrados dos desvios das observações, em relação aos valores ajustados, é mínima. Nesse modelo, y representa a variável dependente, x a concentração do herbicida e a, b, c e d são coeficientes da curva, em que a é a média da resposta da testemunha, b representa a declividade da curva, c é a concentração que proporciona

50% do valor da variável dependente, e d é a média da resposta sob doses elevadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Pode-se verificar que houve ajuste das curvas de dose-resposta ao modelo logístico de quatro parâmetros, para a variável injúria (Figuras 1 e 2). Na análise visual de injúria em pré-emergência e em pós-emergência, não houve interação entre biótipo e dose, havendo significância do efeito simples de biótipos e de dose.

Nas figuras 1 e 2, observa-se aumento da injúria com o aumento de dose de fomesafen, com valores maiores para o biótipo S do que R. Os resultados aos 14 e 21 DAA demonstram que não se visualizou diferença nos danos neste intervalo de tempo. As análises de injúria em aplicações em pré-emergência mostram valores acima de 80% para o biótipo S nas doses de 960, 1920 e 3840 g ha⁻¹ e controle inferior para o biótipo resistente, nas mesmas doses.

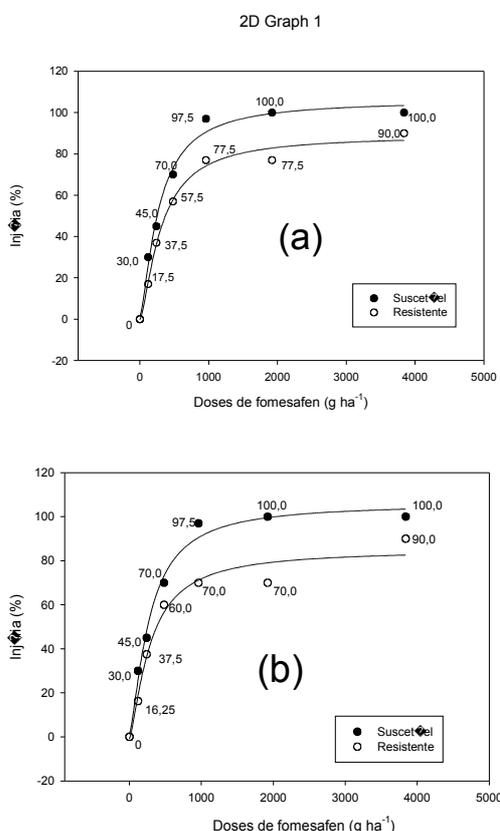


Figura 1 - Injúria (%) às plantas de EPHHL dos biótipos S e R, em função das doses de fomesafen em pré-emergência, aos 14 (a) e 21 dias após a aplicação (b).

Observa-se, que mesmo para o biótipo R a inibidores da enzima PROTOX houve injúria, sendo ela mais expressiva na aplicação em pré-emergência do que em pós-emergência. No nível mais elevado em pós-emergência, de 1600 g ha⁻¹, a injúria ao biótipo R a inibidores da enzima PROTOX foi de 56%, enquanto em nível correspondente de fomesafen na aplicação em pré-emergência, a injúria atingiu aproximadamente 78%.

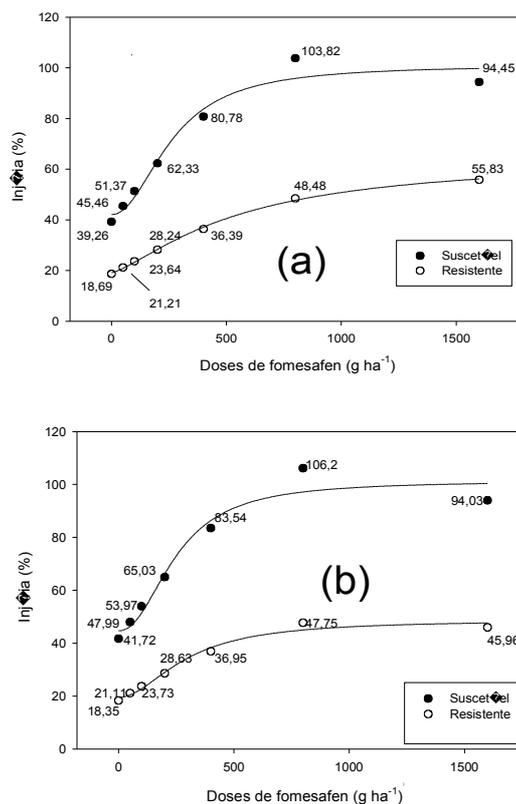


Figura 2 - Injúria (%) às plantas de EPHHL dos biótipos S e R, em função das doses de fomesafen em pós-emergência, aos 14 (a) e aos 21 dias após a aplicação (b).

Para o biótipo S, o uso de 1600 g ha⁻¹ de fomesafen resultou em injúria de 98 e 95%, respectivamente, em pré-emergência e pós-emergência (Figuras 1 e 2). Para o nível de fomesafen recomendado para o controle de EPHHL (200 g ha⁻¹), as diferenças de injúria entre os biótipos S e R a inibidores da enzima PROTOX entre as aplicações em pré e pós foram ainda mais expressivas (Figuras 1 e 2).

Em pré-emergência, a injúria média na primeira avaliação das plantas S foi de 63 % e das plantas R de 51%. Na segunda avaliação foi de 63% para as plantas S e de 49% para as R (Tabela 1).

Em pós-emergência, a injúria média na primeira avaliação das plantas S foi de 68% e das plantas R de 33% e a injúria média na segunda avaliação das plantas S foi 70% e nas plantas R foi de 32% (Tabela 2).

Tabela 1. Injúria em EPHHL aos 14 e 21 dias após a aplicação de fomesafen em pré-emergência.

| Biótipo | Injúria (% em relação à testemunha sem herbicida) | |
|------------|--|----------------------|
| | 14 DAA | 21 DAA |
| Suscetível | 63,21 a ¹ | 63,21 a ¹ |
| Resistente | 51,07 b | 49,11 b |

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste tukey a 5%

Percebe-se maior diferença de injúria entre os biótipos R a inibidores da PROTOX e S no experimento em pós-emergência do que no em pré-emergência, o que pode significar a existência de barreiras mais importantes para a absorção e/ou translocação de fomesafen na parte aérea das plantas ou esta é mais facilmente superada na aplicação em pré-emergência. Sabe-se que a presença de cutícula nas raízes e partes aéreas emergentes das plantas é inferior à da superfície das folhas das plantas, o que poderia explicar o menor efeito de fomesafen no biótipo resistente em relação ao suscetível, na aplicação em pós-emergência.

Tabela 2. Injúria em EPHHL aos 14 e 21 dias após a aplicação de fomesafen em pós-emergência.

| Biótipo | Injúria (% em relação à testemunha sem herbicida) | |
|------------|---|----------------------|
| | 14 DAA | 21 DAA |
| Suscetível | 68,21 a ¹ | 70,35 a ¹ |
| Resistente | 33,21 b | 31,78 b |

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste tukey a 5%

Não houve diferença significativa entre a matéria verde entre os biótipos S e R a inibidores da PROTOX na aplicação de fomesafen em pré-emergência. No entanto, diferenças significativas entre os dois biótipos foram constatadas na aplicação em pós-emergência (Tabela 3), o que concorda com os dados de injúria às plantas de EPHHL. As curvas obtidas através dos valores de matéria verde convertidos para percentagem indicam valores inferiores para o biótipo S, demonstrando o menor acúmulo de fotoassimilados em relação ao biótipo R, devido ao efeito do tratamento com fomesafen (Figura 3). Tal fato indica que questões morfológicas das plantas de EPHHL tenham efeito direto na causa da resistência das mesmas.

Tab 3. Matéria verde de EPHHL aos 21 dias após a aplicação de fomesafen em pós-emergência.

| Biótipo | Matéria Verde |
|------------|---|
| | (% em relação à testemunha sem herbicida) |
| Resistente | 77,97 a ¹ |
| Suscetível | 49,07 b |

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste tukey a 5%

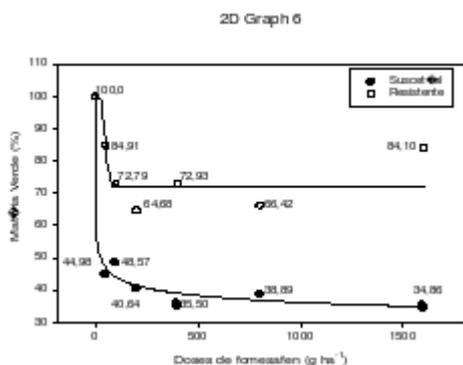


Figura 3 - Matéria Verde (%) de plantas de EPHHL dos biótipos (S e R), em função das doses de fomesafen em pós-emergência (b).

Dayan et al. (1996) aventaram a hipótese de que plantas podem ser selecionadas para resistência a inibidores da enzima PROTOX por meio de mecanismos como modificações na absorção, translocação e metabolização dos herbicidas. Há vários exemplos na literatura demonstrando que a tolerância de plantas daninhas a outros herbicidas como o glyphosate, se deve a uma penetração ou a uma translocação diferencial (Sandberg et al., 1980; Chachalis et al., 2001).

4. CONCLUSÕES

A investigação demonstra haver maiores danos de fomesafen no biótipo de *Euphorbia heterophylla* suscetível aos herbicidas inibidores da enzima PROTOX, em relação ao resistente.

As diferenças entre os biótipos resistente e suscetível são mais acentuadas na forma de aplicação de fomesafen em pré-emergência, em relação à sua aplicação em pós-emergência das plantas.

Há indícios de que a resistência esteja ligada à absorção diferencial do fomesafen entre as plantas resistentes e suscetíveis.

5. REFERÊNCIAS

CHRISTOFFOLETI, P.J. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas / Christoffoleti, P.J. (coord.) 2. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2004. p.4-22.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. *Weed Science.*, v. 49, p. 156-163, 2001.

DAYAN, F. E.; WEETE, J. D.; HANCOCK, H. G. Physiological basis for differential sensitivity to sulfentrazone by sicklepod (*Senna obtusifolia*) and coffee senna (*Cassia occidentalis*). *Weed Science*, v. 44, n. 1, p. 12-17, 1996.

HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível em <http://www.weedscience.com>. Consultado em setembro de 2007.

HIGGINS, J. M. and T. WHITWELL, F. T. CORBIN, G. E. CARTER, Jr., and H. S. HILL, Jr.. Absorption, translocation, and metabolism of acifluorfen and lactofen in pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*) and ivyleaf morningglory (*Ipomoea heredeacea*). *Weed Science*. 36:141-145, 1988.

MATSUMOTO, H., KASHIMOTO, and E. WARABI. Basis for common chickweed (*Stellaria media*) tolerance to oxyfluorfen. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64:47-53, 1999.

RITTER, R. L.; COBLE, H.D. Penetration, translocation, and metabolism of acifluorfen in soybean (*Glycine max*), common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), and common cocklebur (*Xanthium pensylvanicum*). *Weed Science*. 29:474-480, 1981.

SUDA, C. N. K.; PEREIRA, M. F. D. A.; Sensibilidade à luz de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. Durante a germinação. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.9, n. 1, p. 55-64, 1997.

SANDBERG, C. L.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Absorption, translocation and metabolism of 14C- glyphosate in several weed species. *Weed Research*, v. 20, p. 195-200, 1980.

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*, v. 40, p. 101-109, 2005.

TREZZI, M.M., VIDAL, R.A., KRUSE, N. D. e NUNES, A.L. Bioensaios para identificação de Biótipos de *Euphorbia heterophylla*

Synergismus scyentifica UTFPR, Pato Branco, 02 (1,2,3,4) . 2007

com resistência múltipla a inibidores da ALS e ENZIMA ENZIMA PROTOX. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 24, n. 3, p. 563-571, 2006.

UNLAND, D. R., K. AL-KHATIB, and D. E. PETERSON. Interactions between imazamox and diphenylethers. Weed Science. 47:462-466, 1999.

VANSTONE, D. E. And E. H. STOBBE. root uptake, translocation, and

metabolism of nitrofluorfen and oxyfluorfen by fababeans (*Vicia faba*) and green foxtail (*Setaria viridis*). Weed Science. 26:389-392 1978.

WARABI, E., K. USUI, Y. TANAKA, and H. MATSUMOTO. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen b overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. Pest Management Science. 57:743-748, 2001.