

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

DIOGO LUIZ FRUET

**NABIÇA (*Raphanus raphanistrum* L.) RESISTENTE A INIBIDORES DA
ACETOLACTATO SINTASE: MECANISMO DE RESISTÊNCIA, ANÁLISE DE
CRESCIMENTO E ALTERNATIVAS DE CONTROLE**

**LAGES/SC
2021**

DIOGO LUIZ FRUET

**NABIÇA (*Raphanus raphanistrum* L.) RESISTENTE A INIBIDORES DA
ACETOLACTATO SINTASE: MECANISMO DE RESISTÊNCIA, ANÁLISE DE
CRESCIMENTO E ALTERNATIVAS DE CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Mendes de Oliveira Neto.

LAGES/SC

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fruet, Diogo Luiz
NABIÇA (*Raphanus raphanistrum* L.)
RESISTENTE A INIBIDORES DA
ACETOLACTATO SINTASE: MECANISMO DE
RESISTÊNCIA, ANÁLISE DE CRESCIMENTO E
ALTERNATIVAS DE CONTROLE / Diogo Luiz
Fruet. -- 2021.
101 p.

Orientador: Antonio Mendes de
Oliveira Neto
Coorientador: Fabio
Nascimento
Dissertação (mestrado) -- Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal, Lages, 2021.

1. Controle químico. 2. dose resposta. 3. mutação. 4.
Raphanus raphanistrum. I. Oliveira Neto, Antonio
Mendes de. II. Nascimento, Fabio. III. Universidade
do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal. IV. Título.

Dedico este trabalho a Deus e a minha família:
meu pai Mauri, minha mãe Luciane, e minhas
irmãs Diana e Debora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas a mim, por me proteger e guiar.

Agradeço imensamente à minha família, meu pai Mauri Luiz Fruet e minha mãe Luciane de Lourdes Zapelaro Fruet, que sempre foram meus alicerces e foram minha fonte de inspiração para ir em busca de meus objetivos. Nos momentos difíceis sempre me fizeram mais confiante e me indagaram a coragem, nos momentos de alegria. São as melhores pessoas desse mundo, as quais agradeço todos os dias por tê-las. Minhas irmãs, que são minhas maiores companheiras, sempre me incentivaram e me apoiaram durante minha carreira profissional. Além disso me proporcionam momentos que jamais serão esquecidos. A meus avós, que sempre incentivaram e me deram o apoio para seguir minha carreira com a agricultura, em especial aqui meu avô Antonio, que às vezes implicante, mas nunca deixou de me apoiar e confiar. Sem eles não teria conseguido este nobre momento de formação, não tenho palavras para descrever o meu sentimento. Obrigado por serem meu porto seguro. Amo vocês!

A toda minha família, que sempre demonstrou interesse, incentivo e orgulho pela minha carreira, sempre fizeram o possível para que estivesse nas melhores oportunidades possíveis. Meu muito obrigado a todos.

Ao meu orientador, professor, amigo e fonte de inspiração, Dr. Antonio Mendes de Oliveira Neto, pelo incentivo, agradeço a confiança depositada em mim. Obrigado pelas orientações, pelos ensinamentos, pelas cobranças. Sem dúvida, mudou meu jeito de pensar, dentro e fora do meio acadêmico. Meu muito obrigado.

Ao meu amigo Ricardo Biasiolo, amigo antigo, que convivi durante este momento da minha vida, os ensinamentos, reflexões, conversas e estímulos. Sem dúvida se tornou mais que um amigo, um irmão. Muito obrigado por tudo.

À minha colega de mestrado Mayra Luiza Schelter e aos colegas do Laboratório de Plantas Daninhas e Herbicidas, pelo auxílio na condução dos experimentos, momentos de distração e pela curiosidade de estar participando desta tarefa nobre, contribuindo com a pesquisa, com certeza sem estas pessoas, não seria possível alcançar o resultado deste trabalho. Meu muito obrigado a todos.

Agradeço também aos colegas de curso, pelos momentos de conversa, troca de conhecimento e companheirismo nos diversos momentos.

Agradeço ao Fernando Sartori e ao Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva pelo auxílio na execução das análises moleculares.

Ao CAV/UEDESC, pela formação de qualidade, os professores do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pelo conhecimento repassado e pelos momentos de conversa. Orgulho em fazer parte desta instituição. E a todos os funcionários.

À pessoa mais legal do Universo: Flávia Regina Retore.

A todos meus amigos que fiz nesta cidade, Leonardo Lemos, João Pedro Rossi, Sergio Boscato, Felipe Darlan, Mateus Simas, Luiz Biasiolo, Samuel Sá, Marcel Seich, Germano Boldo, Felipe Fiorin, Lucas Parisotto, Jean Menegatti. Todos os participantes da República Galgos, os quais tem lugar especial em minha vida, pelas rodas de mate, churrascos, momentos “fitness” e todos os momentos de conversa e motivação. Meu muito obrigado a todos.

Agradeço a todos que de forma indireta ou direta estiveram envolvidos com a condução destes experimentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e a UDESC/PROMOP, pela disponibilização da bolsa de estudo para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A todo o incentivo e comprometimento da Sociedade Brasileira de Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD), pelos eventos e condução de discussões a respeito da resistência de plantas daninhas no Brasil.

“A persistência é o menor caminho para o
êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

A cultura do trigo está sujeita à interferência de plantas daninhas, principalmente quando convive com nabiça, azevém e aveia-daninha. A principal medida de controle é o método químico, predominando a aplicação de herbicidas inibidores da enzima ALS (acetolactato sintase). Esse grupo apresenta vantagens agronômicas, toxicológicas e ecotoxicológicas, entretanto, devido ao uso intensivo surgiram plantas daninhas resistentes. O objetivo do trabalho foi comprovar a resistência cruzada de um biótipo de nabiça a herbicidas inibidores da ALS, por meio de um ensaio de dose resposta, verificar o mecanismo de resistência, verificar o crescimento dos biótipos e indicar as alternativas para o controle químico. Todos os experimentos foram realizados em casa de vegetação, onde primeiramente foram realizados ensaios de dose resposta em duas gerações, a primeira oriunda da população, coletadas de 10 plantas e a segunda com sementes da geração F1 (F2) obtidas através de autofecundação. Foram testadas doses crescentes de três herbicidas inibidores de ALS (metsulfuron-methyl, imazethapyr e pyroxsulam, sendo a dose recomendada de 3,96; 106,0 e 15,3 g.ia ha⁻¹, respectivamente) e dois biótipos (suscetível e com suspeita de resistência). Após a realização do trabalho de dose resposta, foi estudado o mecanismo de resistência, onde foram desenvolvidos dois trabalhos: um com a busca pela resistência devido à mutação do sítio de ação, onde foram realizadas análises moleculares; e outro, onde foi avaliado se o aumento da metabolização era um mecanismo envolvido na resistência. Outro trabalho foi conduzido para estudar a diferença de crescimento entre os biótipos, onde foram comparados o desenvolvimento dos biótipos resistente e suscetível. Como parte final foram desenvolvidos dois ensaios, um para avaliar alternativas para o controle químico do biótipo resistente. Nos ensaios de dose resposta foi avaliada a porcentagem de controle aos 21 dias após a aplicação. No ensaio de metabolização e alternativa de controle o procedimento foi a avaliação da matéria seca e controle visual. Para avaliação da mutação utilizou-se programa de bioinformática, buscando as mudanças de aminoácidos em posições já descritas das mutações que conferem resistência aos inibidores da ALS. Nos ensaios de dose resposta, comprovou-se a resistência, o controle máximo foi de 50, 41 e 30% para metsulfuron-methyl, imazethapyr e pyroxsulam, respectivamente. Foram obtidos FR₂₅ de 220 para metsulfuron-methyl, FR₂₅ de 388 para imazethapyr e FR₂₅ de 706 para pyroxsulam. Na geração F2, foram obtidos controle máximo de 55, 88 e 77,5% para metsulfuron-methyl, imazethapyr e pyroxsulam, respectivamente. O FR₅₀ na geração F2 foi de 1516 para metsulfuron-methyl, FR₅₀ de 58,98 para imazethapyr e FR₅₀ de 247,7 para pyroxsulam. O aumento da metabolização não foi um mecanismo envolvido

com a resistência, baseando-se nos dados do experimento com malathion. Todavia, encontrou-se uma mutação na enzima alvo, no sítio de ação, na posição 574, com a substituição do triptofano por leucina. Com a execução do trabalho de curva de crescimento, percebeu-se uma diferença de crescimento entre o biótipo resistente em relação ao suscetível. No controle alternativo todos os tratamentos avaliados foram eficientes para o controle do biótipo resistente.

Palavras-chave: Controle químico, dose resposta, mutação, *Raphanus raphanistrum*

ABSTRACT

The wheat crop is subject to weed interference, especially when it coexists with wild radish, ryegrass and weed oats. The main control measure is the chemical method, predominantly the application of herbicides that inhibit the ALS enzyme (acetolactate synthase). This group has agronomic, toxicological and ecotoxicological advantages, however, due to intensive use, resistant weeds have emerged. The objective of this work was to prove the cross-resistance of a wild radish biotype to ALS-inhibiting herbicides, through a dose-response assay, to verify the resistance mechanism, to verify the growth of biotypes and to indicate alternatives for chemical control. All experiments were carried out in a greenhouse, where first dose-response assays were carried out in two generations, the first from the population, collected from 10 plants and the second with seeds of the F1 (F2) generation obtained through self-pollination. Increasing doses of three ALS-inhibiting herbicides (metsulfuron-methyl, imazethapyr and pyroxsulam) were tested, the recommended dose being 3.96; 106.0 and 15.3 g ai ha⁻¹, respectively) and two biotypes (susceptible and suspected of resistance). After performing the dose-response work, the mechanism of resistance was studied, where two works were developed: one with the search for resistance due to mutation of the site of action, where molecular analyzes were performed; and another, where it was evaluated whether the increase in metabolization was a mechanism involved in resistance. Another work was carried out to study the difference in growth between biotypes, where the development of resistant and susceptible biotypes were compared. As a final part, two tests were developed, one to evaluate alternatives for the chemical control of the resistant biotype, based on molecules registered in the wheat crop. In the dose-response assays, the percentage of control at 21 days after application was evaluated. In the metabolization test and control alternative, the procedure was the evaluation of dry matter and visual control. To evaluate the mutation, a bioinformatics program was used, looking for amino acid changes in positions already described in the mutations that confer resistance to ALS inhibitors. In the dose-response assays, resistance was proven, the maximum control was 50, 41 and 30% for metsulfuron-methyl, imazethapyr and pyroxsulam, respectively. RF25 of 220 for metsulfuron-methyl, RF25 of 388 for imazethapyr and RF25 of 706 for pyroxsulam were obtained. In the F2 generation, maximum control of 55, 88 and 77.5% was obtained for metsulfuron-methyl, imazethapyr and pyroxsulam, respectively. The RF50 in the F2 generation was 1516 for metsulfuron-methyl, RF50 58.98 for imazethapyr and RF50 247.7 for pyroxsulam. Increased metabolization was not a mechanism involved with resistance, based on data from the malathion experiment. However, a mutation was found in the target enzyme, at the site of action, at

position 574, with the replacement of tryptophan by leucine. With the execution of the growth curve work, it was noticed a growth difference between the resistant biotype in relation to the susceptible one. In the alternative control, all evaluated treatments were efficient to control the resistant biotype.

Keywords: Chemical control, dose response, mutation, *Raphanus raphanistrum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diagrama esquemático da sequência do gene ALS (5' 3') de *R. raphanistrum*. As caixas sombreadas, C (nt 88/144), A (nt 316/354), D (nt 358/375) e B (nt 1465/1476) representam quatro domínios altamente conservados do gene ALS. As posições dos sete polimorfismos de nucleotídeos (ou mutações) observadas em sequências de ALS de *R. raphanistrum* examinadas que resultaram em substituições de aminoácidos na enzima estão marcadas pelas setas. 30
- Figura 2** – Curvas de dose resposta para Metsulfuron-Methyl, A: Biótipo Resistente primeira geração, B: Biótipo Suscetível primeira geração, C: Biótipo Resistente segunda geração e D: Biótipo Suscetível segunda geração. 54
- Figura 3** – Curvas de dose resposta para Imazethapyr, A: Biótipo Resistente primeira geração, B: Biótipo Suscetível primeira geração, C: Biótipo Resistente segunda geração e D: Biótipo Suscetível segunda geração. 56
- Figura 4** – Curvas de dose resposta para Pyroxulam, A: Biótipo Resistente primeira geração, B: Biótipo Suscetível primeira geração, C: Biótipo Resistente segunda geração e D: Biótipo Suscetível segunda geração. 58
- Figura 5** – Altura (cm) dos biótipos de nabiça resistente e suscetível, A: cultivo solteiro e B: cultivo em competição. 76
- Figura 6** – Número de folhas nos biótipos de nabiça resistente e suscetível. A: Cultivo solteiro, B: Cultivo em competição. 77
- Figura 7** – Área foliar (cm²) para os biótipos de nabiça suscetível e resistente. A: Cultivo solteiro, B: Cultivo em competição. 78
- Figura 8** – Resultado obtidos para massa seca (MS em g) nos biótipos resistente e suscetível. A: MS total no cultivo solteiro, B: MS total no cultivo em competição, C: MS parte aérea no cultivo solteiro, D: MS da parte aérea no cultivo em competição, E: MS de raízes no cultivo solteiro, F: MS de raízes no cultivo em competição. 80
- Figura 9** – Matéria seca (g) das estruturas reprodutivas dos biótipos de nabiça resistente e suscetível, A: cultivo solteiro e B: cultivo em competição. 81
- Figura 10** – Análises de crescimento dos biótipos de nabiça resistente e suscetível. A: taxa de crescimento relativo (g g⁻¹ dia⁻¹) cultivo solteiro, B: Taxa de crescimento relativo cultivo em competição, C: Taxa assimilatória líquida (g cm² dia⁻¹) cultivo solteiro, D: Taxa assimilatória líquida cultivo em competição, E: Razão de área foliar (cm² g⁻¹) cultivo solteiro, F: Razão de área foliar cultivo em competição. 83
- Figura 11** – Avaliação da produção de sementes nos biótipos de nabiça resistente e suscetível. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições climáticas no momento da aplicação dos herbicidas inibidores de ALS na geração F1 de <i>Raphanus raphanistrum</i>	48
Tabela 2 – Condições climáticas no momento da aplicação dos herbicidas inibidores de ALS na geração F2 de <i>Raphanus raphanistrum</i>	49
Tabela 3 – Primers utilizados para amplificação e sequenciamento do gene ALS em populações de <i>Raphanus raphanistrum</i> suscetíveis e resistente a inibidores de ALS	50
Tabela 4 – Fator de resistência, dose letal (g i.a.ha ⁻¹) e controle máximo (%) obtidas nas duas gerações F1 e F2 para metsulfuron-methyl.	55
Tabela 5 – Fator de resistência, dose letal (g i.a.ha ⁻¹) e controle máximo (%) obtidas nas duas gerações F1 e F2 para imazethapyr.	57
Tabela 6 – Fator de resistência, dose letal (g i.a.ha ⁻¹) e controle máximo (%) obtidas nas duas gerações F1 e F2 de Penoxsulam.....	59
Tabela 7 – Sequências nucleotídicas e aminoácidos correspondentes encontradas nos biótipos de nabiça.	60
Tabela 8 – Controle (%) e matéria seca (g), em diferentes tratamentos com e sem a utilização de bloqueador de P450 (malathion) em biótipo resistente de nabiça a inibidores de ALS.	62
Tabela 10 – Ciclo e estágios fenológicos observados para os biótipos de nabiça.	86
Tabela 11 – Controle (%), sobrevivência (%) e massa seca da parte aérea (g vaso ⁻¹) do biótipo de <i>R. raphanistrum</i> resistente a inibidores de ALS, com herbicidas alternativos aos 28 DAA.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dm ²	Decímetro quadrado
i.a.	Ingrediente ativo
g	Gramma
°C	Graus Celsius
kg	Kilograma
kPa	Kilopascal
μL	Microlitro
μm	Micrometros
mm	Milímetros
m	Metro
m ²	Metro Quadrado
M	Molar
%	Por cento
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
L	Litro
ha	Hectare

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Características da nabiça e interferência.....	20
2.2 Manejo de plantas daninhas na cultura do trigo.....	22
2.3 Resistência de plantas daninhas a inibidores da acetolactato sintase (ALS)	23
2.4 Mecanismos de resistência a herbicidas inibidores da ALS.....	27
2.5 Custo ecológico da resistência de plantas daninhas a herbicida.....	30
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4 RESISTÊNCIA CRUZADA E MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE NABIÇA A HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS	42
4.1 RESUMO.....	42
4.2 ABSTRACT.....	43
4.3 INTRODUÇÃO	44
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.4.1 Coleta das sementes e biótipos.	47
4.4.2 Ensaios de dose resposta na geração F1.	47
4.4.3 Ensaios de dose resposta na geração F2.	48
4.4.4 Ensaio para identificação de mutação na enzima ALS.	49
4.4.4.1 Extração de DNA	49
4.4.4.2 PCR e Sequenciamento.....	50
4.4.5 Ensaio com inibidor de metabolização	51
4.4.6 Análise estatística	52
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.5.1 Dose Resposta	53
4.5.1.1 Metsulfuron-methyl.....	53
4.5.1.2 Imazethapyr.....	55
4.5.1.3 Pyroxulam	57
4.5.2 Mecanismo de resistência	59
4.5.2.1 Ensaio para identificação de mutação na enzima ALS.....	60
4.5.2.2 Ensaio com inibidor de metabolização	61
4.6 CONCLUSÃO	64
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
5 ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE BIÓTIPOS DE <i>Raphanus raphanistrum</i> SUCETIVEL E RESISTENTE A HERBICIDAS	69
5.1 RESUMO.....	69

5.2 ABSTRACT.....	70
5.3 INTRODUÇÃO	71
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
5.4.1 Obtenção do material.....	73
5.4.2 Condução.....	73
5.4.3 Avaliação e Análise Estatística.....	74
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.6 CONCLUSÕES.....	87
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
6 ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DE NABIÇA COM RESISTÊNCIA CRUZADA A INIBIDORES DA ALS	91
6.1 RESUMO.....	91
6.2 ABSTRACT.....	92
6.3 INTRODUÇÃO	93
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	94
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
6.6 CONCLUSÕES.....	99
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

1 INTRODUÇÃO

O surgimento das plantas daninhas está diretamente relacionado à agricultura. Percebeu-se, no início, que se desenvolviam outras espécies juntamente às plantas cultivadas, com significativo potencial de interferência. Com o crescimento da população e, conseqüentemente, maior interferência antrópica nos cultivos, iniciou-se um processo gradual de seleção. As espécies sem interesse agrícola passaram a ser indesejadas e sua multiplicação e alta capacidade de adaptação permitiram-lhes sobreviver em diversos ambientes, tornando necessária a adoção de medidas de controle (OLIVEIRA JUNIOR; CONSTANTIN; INQUE, 2011)

Com o desenvolvimento dos herbicidas, o controle de plantas daninhas foi facilitado, assim o manejo químico foi usado de maneira predominante, por suas vantagens, dentre as quais pode-se listar: seletividade às culturas, elevada eficiência de controle, facilidade de uso, menor custo, e possibilidade de utilização em diferentes condições edafoclimáticas (AGOSTINETTO et al, 2010)

Devido a rápida difusão e ampla adoção do controle químico, logo surgiram biótipos de plantas daninhas resistentes. A resistência é entendida como habilidade natural e herdável de alguns biótipos dentro da população em sobreviver e se reproduzir após a exposição a uma dose do herbicida que seria letal a população original, suscetível (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2016).

A resistência evolui de um processo chamado pressão de seleção, onde a utilização contínua do mesmo herbicida, ou utilização de ingredientes ativos diferentes, mas com o mesmo mecanismo de ação, seleciona os biótipos resistentes. A resistência já existe naturalmente devido à grande variabilidade genética das populações de plantas daninhas. A variabilidade natural das plantas daninhas é a fonte para o surgimento de resistência; em uma pequena área, por exemplo, pode-se ter plantas totalmente diferentes, embora muitas vezes isso não seja perceptível ao olho humano (SCHAFFRATH et al., 2007).

Não se tem nenhuma informação na literatura que comprove o desenvolvimento de alguma anormalidade na planta por parte do herbicida, ou seja, que demonstre que o herbicida cause alguma mutação na planta, que resulte em resistência (RIZZARDI; VIDAL; FLECK; AGOSTINETTO, 2002). Dessa forma, ele apenas seleciona na população as plantas que previamente já são resistentes.

A resistência a herbicidas atualmente é o principal problema que atinge a Ciência das Plantas Daninhas, pois afeta diretamente o controle químico. Com essa evolução, a principal ferramenta de controle vem sendo gravemente comprometida ao longo dos anos. Além disso,

existem poucas opções remanescentes para o controle, assim cada ferramenta que é perdida restringe drasticamente as opções para o manejo de plantas daninhas (BRUNHARO et al., 2014).

A cultura do trigo vem sofrendo com a desvalorização comercial nos últimos anos. Além de margem líquida reduzida, devido aos baixos preços, os agricultores vêm enfrentando dificuldades no manejo, o que contribui para o agravamento da situação. O controle químico é o método mais utilizado para controle das principais plantas daninhas que afetam a cultura, sendo as de maior importância a nabiça (*Raphanus raphanistrum* e *R. sativus*), o azevém (*Lolium multiflorum*) e a aveia-daninha (*Avena* spp.) (MACIEL; MORAES; BALAN, 2011). Para controle destas plantas os herbicidas inibidores de ALS, são os mais efetivos, sendo pela seletividade a cultura, alta eficiência, classificação toxicológica e ecotoxicológicas favorável e custo competitivo (AGOSTINETTO et al., 2008).

A espécie *R. raphanistrum* vem apresentando alguns problemas com controle no Oeste do Paraná, onde a cultura do trigo é uma das mais afetadas. Já foram encontrados biótipos de nabiça resistentes a inibidores de ALS no Brasil.

O problema mundial mais grave está na Austrália, onde foi comprovada resistência a cinco mecanismos de ação, ALS (B), Fotossistema II (C1), Inibidor de PDS (F1), Inibidores da HPPD (F2), Auxina sintética (O) em outro caso com confirmação de resistência múltipla a quatro mecanismos inclui-se os herbicidas do modo de ação inibidores de AGCML (HEAP, 2021), restando somente saflufenacil (Inibidor da protox) como opção para o controle químico seletivo desta planta daninha. (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2001).

Estudos de capacidade competitiva têm sido amplamente utilizados para verificar a resposta da interação de uma espécie ou biótipo particular na presença de seu competidor para avaliar a capacidade de uma planta para suprimir o desenvolvimento de outra com ou sem prejuízo do seu crescimento (GOLDBERG; LANDA, 1991). Além disso, esses estudos, são importantes para o desenvolvimento estratégias de manejo e para ajudar a prevenir a evolução da resistência das plantas daninhas (HENCKES et al., 2019).

A manutenção da eficiência do controle químico é importante para manter a cultura atrativa e presente na rotação de culturas no Sul do Brasil. A hipótese deste trabalho é que o biótipo investigado é resistente aos inibidores da ALS, e que a resistência é do tipo cruzada, ou seja, compromete todos os grupos químicos inibidores da ALS, e a resistência deve-se à mutação na enzima alvo e não ao aumento da capacidade de metabolização do herbicida. Também como hipótese destaca-se que os demais mecanismos de ação de herbicidas mantem a eficiência no controle da nabiça.

O objetivo desta pesquisa foi confirmar a resistência cruzada de um biótipo de nabiça oriundo de Catanduvas/PR, aos herbicidas inibidores de ALS; verificar se o mecanismo de resistência se deve a uma alteração no sítio de ação ou não; avaliar as alternativas para o controle químico do biótipo resistente; e investigar se o biótipo resistente tem algum comprometimento no crescimento.

Esta dissertação é composta por três capítulos, onde são demonstrados, na parte inicial, os trabalhos de dose resposta; na segunda parte, as informações da elucidação do mecanismo de resistência e a análise de crescimento dos biótipos; e, no último, são demonstrados os resultados da pesquisa de alternativas para o controle químico do biótipo resistente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características da nabiça e interferência

A nabiça (*R. raphanistrum*) é uma planta anual de inverno, com raiz principal delgada, hastes principais com 30 a 90 cm de altura, ramificadas. As folhas são pecioladas curtas, ovadas-oblongas, com 5 a 20 cm de comprimento, as folhas do caule superior são reduzidas, pecioladas e geralmente inteiras. A inflorescência é ramificada, as flores têm de 12 a 18 mm de diâmetro com sépalas eretas e fechadas, pétalas amarelas ou menos comumente branco ou roxo, geralmente com venação escura ou violeta; quatro estames longos e dois curtos (arranjo tetradinâmico). Os pedicelos de frutificação têm 1 a 2,5 cm de comprimento. O fruto é uma sílica quase cilíndrica, quando fresco, mede 2 a 7,5 cm de comprimento, 3 a 6 mm de espessura, com uma ponta sem bico de 1 a 3 cm de comprimento. Quando seco o fruto é amadeirado, com várias nervuras no comprimento e geralmente se contrai entre as sementes. Quando madura, o fruto se divide transversalmente nas juntas, dividindo-se em unidades cada uma mantendo uma semente (WARWICK; FRANCIS, 2005).

Esta espécie apresenta lâmina foliar com espessura média de 217,28 μm . As epidermes são simples, sendo a adaxial pouco mais espessa que a abaxial. Seu mesofilo foliar é dorsiventral, pouco compacto, o parênquima paliádico apresenta uma camada de células com espessura média de 61,95 μm , e a espessura média do parênquima lacunoso é de 126,23 μm . As folhas são anfiestomáticas, e nas duas faces os estômatos estão dispostos no mesmo nível das demais células epidérmicas e apresentam grandes câmaras subestomáticas. Tanto na face adaxial quanto na abaxial os estômatos são anisocíticos, sendo os da face adaxial pouco maiores. Foi verificada maior presença de estômatos na face abaxial das folhas, porém essa diferença foi pequena. Tricomas tectores unicelulares não-ramificados foram observados na face adaxial das folhas. A cutícula é mais espessa na face adaxial das folhas. Sua taxa de vascularização foliar média é de um feixe a cada 590 μm de largura foliar. (FERREIRA et al, 2002). *R. raphanistrum* apresenta grande espessura da cutícula da face adaxial, o que é considerada uma barreira a absorção de herbicidas, principalmente os lipofílicos (FERREIRA et al., 2002).

A nabiça é uma planta originária da Europa Meridional, amplamente disseminada pelas regiões de clima temperado e subtropical do mundo. No Brasil ocorre com frequência na região Sul e em menor escala na região Sudeste e Centro Oeste. Pertence à família Brassicaceae, denominada anteriormente de Cruciferae, pois o arranjo das quatro pétalas de suas flores tem a

disposição de uma cruz (KISSMANN, 1999). Durante a fase vegetativa a porção aérea do caule é pouco desenvolvida, ramificando-se intensivamente. Possui raiz pivotante e cilíndrica (LORENZI, 2006).

Em estudo com oito populações de nabiça, Sahli et al. (2008) perceberam diferenças entre os diferentes biótipos, sendo a principal diferença, o tempo de floração e formação do botão floral, estas características de adaptação, foram as principais causas que permitiram que *R. raphanistrum* se torna uma planta daninha importante.

A hibridação é frequente entre as espécies do gênero *Raphanus* (*sativus* e *raphanistrum*). Hovick et al. (2012), verificou que populações híbridas produziram pelo menos três vezes mais sementes que as populações selvagens, impulsionada por maior emergência e precocidade de plântulas híbridas e maior taxa de sobrevivência, esse trabalho mostrou também que hibridação pode aumentar o sucesso de adaptação e colonização em novos habitats.

R. raphanistrum é extremamente bem-sucedida devido às características: germinação em uma ampla gama de condições ambientais, ciclo de vida altamente flexível, alta produção de sementes e banco de sementes com longa duração, além disso apresenta grande diversidade genética, o que facilita a sua adaptação em vários agroecossistemas (WALSH; OWEN; POWLES; 2007). Dessa maneira, devido à sua grande diversidade genética contribui na seleção de biótipos resistentes a herbicidas. Na região Sul ocorre com mais intensidade na época de inverno, é uma planta resistente a baixas temperaturas e o seu florescimento é estimulado por dias longos, e por isso no inverno ocorre maior desenvolvimento vegetativo (KISSMANN; GROTH; 1999)

Como planta daninha possui elevada habilidade competitiva, isso ocorre principalmente devido à prolificidade da espécie. *R. raphanistrum* produz uma grande quantidade de sementes viáveis, infestando intensamente as culturas, especialmente cereais de inverno, como o trigo (LORENZI, 2006). É uma planta daninha que compete por recursos do meio, como água, nutrientes e luz.

Em estudo realizado por Barroso, Yamauti e Alves (2010), verificando a capacidade de interferência de *R. raphanistrum* e outras plantas daninhas, observou que a nabiça tem uma capacidade de interferência que é capaz de reduzir a produtividade em até 33,4% na cultura do trigo.

Vários pesquisadores estudaram a interferência da nabiça no crescimento e produtividade do trigo. Streibig et al. (1989) relataram que uma planta individual de nabiça tem a capacidade competitiva com o trigo de 5 a 10 vezes maior que o azevém (*Lolium rigidum*). Cheam e Code (1995) mostraram que 25 plantas de nabiça m⁻² reduziram a produtividade do

trigo de 7 a 11%. A redução de produtividade aumentou para 25 a 33% quando a densidade de nabiça era de 100 plantas m⁻².

Souza, Machado e Velini (2001), buscaram verificar a capacidade competitiva do milho frente a algumas plantas daninhas, dentre elas o nabo (*R. sativus*), os resultados demonstram que a planta é capaz de reduzir a capacidade produtividade, sendo que sem a realização do controle, reduz drasticamente a matéria seca da planta de milho, além disso, consegue manter o seu crescimento.

Em estudo realizado por Wandscheer e Pastorini (2008), buscando verificar a interferência alopatíca de *R. raphanistrum*, sobre a germinação de alface e tomate, percebeu-se que os extratos feitos a partir desta planta reduziram as variáveis analisadas, sendo que na concentração de 10% de composto extraído das plantas, reduziu em quase 50% a porcentagem de germinação das espécies indicadoras.

2.2 Manejo de plantas daninhas na cultura do trigo

Diversos fatores limitam a produtividade do trigo, dentre os quais se destaca a interferência imposta por plantas daninhas. A intensidade da interferência normalmente é avaliada por meio de decréscimos de produção e/ou pela redução no crescimento da planta cultivada, como respostas à competição pelos recursos de crescimento disponíveis no ambiente, a alelopatia e aos efeitos indiretos. Entretanto, os resultados da relação planta daninha-cultura dependem, também, de outros fatores específicos, que incluem variações meteorológicas, composição e população das espécies presentes e práticas de manejo (AGOSTINETTO et al., 2008).

Ambrosi et al. (2000) mencionaram que em apenas 76,8%, 75,1% e 45,2%, respectivamente, das lavouras nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, apresentaram medidas de controle adequadas. Em termos mundiais, estima-se que a quebra da produção potencial de trigo devido à interferência das plantas daninhas não exceda 10%, estando o prejuízo causado pelas plantas daninhas, dependente de qual espécie foi submetido a interferência (IAPAR, 2002).

Desse modo, determinar o período de controle das plantas daninhas é imprescindível para obter sucesso na produtividade e para a escolha do método de controle ideal, pois o grau de interferência entre plantas daninhas e a cultura pode ser alterado em função do período em que a comunidade estiver disputando determinado recurso (BRIGHENTI et al., 2004). No manejo do trigo, as plantas daninhas devem ser controladas no início do desenvolvimento da

cultura, devendo esse ser eficiente e realizado na época ideal para que não ocorram perdas pela interferência de plantas daninhas (AGOSTINETTO et al., 2008). No entanto essa época não é bem definida (ZAGONEL, 2005). De acordo com Agostinetto et al. (2008) o período crítico de prevenção a interferência para a cultura vai dos 14 a 24 dias após a emergência.

O nabo, mesmo apresentando características distintas da cultura do trigo, pode causar efeitos negativos significativos à cultura, pois apresenta elevado desenvolvimento vegetativo, sendo seu porte superior à estatura do trigo. Mesmo em culturas que apresenta similaridade as plantas cultivadas, pode gerar grande interferência, em estudo conduzido com cultivares de soja, Bianchi et al. (2010) observaram que quando há convivência da cultura com plantas de nabo, algumas cultivares não apresentaram redução no crescimento e suportaram a presença da espécie competidora, mas, quando competiram pelos recursos do solo, por exemplo, a planta daninha se mostrou mais ávida na interceptação desses quando disponíveis no ambiente de competição.

Para o controle das espécies daninhas em lavouras tritícolas, dispõe-se de alguns herbicidas eficientes e seletivos (LAMEGO et al., 2013). O controle químico de plantas daninhas na cultura do trigo é amplamente utilizado por seu maior rendimento operacional e eficácia em áreas extensas.

O controle químico é o método mais utilizado para o manejo de plantas daninhas por apresentar maior eficiência, ser prático e rápido, quando comparado com outros métodos, por exemplo, o controle mecânico é muito dificultado na cultura devido ao espaçamento entrelinhas reduzido, assim os equipamentos causam danos a cultura e levam a redução no estande. O manejo de plantas daninhas representa uma prática fundamental no sistema de produção agrícola para manter elevada produtividade dos cultivos, constituindo o controle químico a tecnologia mais empregada (FRAGA, 2012).

Atualmente, segundo informações do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit)/Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA (2021), oito moléculas registradas para aplicação em pós-emergência da cultura e das plantas daninhas, sendo quatro inibidores de ALS (metsulfuron-methyl, imazamox, pyroxsulam e iodosulfuron-methyl), dois mimetizadores de auxina (2,4-D e MCPA) e dois inibidores do fotossistema II (bentazon e metribuzin). Assim ressalta-se que existem poucas opções para o controle químico de plantas daninhas em pós-emergência na cultura do trigo.

2.3 Resistência de plantas daninhas a inibidores da acetolactato sintase (ALS)

Os herbicidas inibidores da ALS são amplamente utilizados devido à reduzida toxicidade em mamíferos, ampla seletividade às culturas e elevada eficácia em baixas doses (YU et al., 2003). Existem muitos herbicidas comerciais inibidores da ALS, indicativo da importância para o controle de plantas daninhas em muitas culturas (SHANER, 1999).

Segundo Heap (2021) foram comprovadas um total de 658 registros de resistência destes herbicidas. É o grupo que apresenta maior número de plantas resistentes, a maioria das plantas com resistência pertence ao grupo das Magnoliopsidas, com envolvimento das principais culturas graníferas, sendo a que apresenta maior quantidade de espécies resistentes a esse grupo, a cultura do trigo. No Brasil, até o momento, foram confirmadas resistência em 20 espécies, o maior número são Magnoliopsidas, sendo as mais problemáticas pertencentes aos gêneros *Amaranthus*, *Raphanus*, *Bidens* e *Euphorbia*. As culturas mais atingidas são as culturas de grãos e também o algodão; a maior resistência nessas culturas deve-se ao uso intensivo e também a maior área de cultivo. As regiões mais problemáticas, são as maiores produtoras de grãos do país, que envolve a região Sul e região Centro Oeste.

Dentre os inibidores da ALS os grupos químicos sulfonilureia, imidazolinonas e triazolopirimidina são amplamente utilizados para o controle de plantas daninhas em cereais, leguminosas e pastagem. Destaca-se nesses grupos, as sulfonilureia, principalmente no controle de Magnoliopsidas, incluindo *R. raphanistrum*, em cereais de inverno (HASHIM et al., 2001). Desse grupo químico, metsulfuron-methyl tem sido aplicado com frequência para controlar esta planta daninha na cultura do trigo e cevada (MARCHIORO; FRANCO, 2010).

De acordo com o Comitê de Ação a Resistência aos herbicidas (HRAC), a definição de resistência é "a capacidade natural e hereditária de alguns biótipos de plantas daninhas em uma dada população, em sobreviver a um tratamento herbicida, que deveria efetivamente controlar a população em condições normais de utilização". O avanço da resistência aparece pela seleção exercida na população de plantas, devido ao uso repetido do mesmo herbicida ou de herbicidas com mesmo mecanismo de ação, ou seja, por práticas agronômicas pobres.

O uso recorrente do mesmo herbicida é fator determinante para surgimento da resistência, segundo Powles e Yu (2010) é comum em sistemas de monocultivo em áreas extensivas, que certos herbicidas sejam aplicados preferencialmente para o controle das plantas daninhas. É comum também que muitas vezes, o agricultor use apenas um herbicida (ou herbicidas semelhantes) nas diversas safras.

A resistência cruzada ocorre quando biótipos de plantas daninhas são resistentes a dois ou mais herbicidas, devido a um só mecanismo de resistência (CHRISTOFFOLETI, 2004). Já a resistência múltipla ocorre quando um indivíduo possui um ou mais mecanismos de resistência

distintos que conferem o comportamento resistente a herbicidas com mecanismo de ação diferenciado (CHRISTOFFOLETI, 2004). Enquanto a tolerância é o termo agrônomo que define a capacidade natural hereditária de uma espécie para sobreviver e se reproduzir após o tratamento com um princípio ativo. Ou seja, são aquelas que não são controladas por um herbicida em particular e nunca foram controladas por esse ingrediente ativo, é uma característica de todos os indivíduos da espécie (CHRISTOFFOLETI, 2004).

A evolução da resistência das plantas daninhas aos herbicidas é influenciado por vários fatores, entre os quais aqueles ligados ao herbicida, como ingrediente ativo altamente eficiente, moléculas que apresentam um único local de ação, herbicidas com residual prolongado e utilização intensiva do mesmo herbicida ou de produtos diferentes, mas com o mesmo mecanismo de ação, que selecionam mais rapidamente o biótipo resistente. A biologia da planta daninha também pode influenciar a taxa na qual a resistência se desenvolve, como é o caso das plantas daninhas de ciclo anual, que podem desenvolver resistência mais rapidamente do que as espécies bianuais ou perenes, pois um maior número de gerações é submetido ao agente selecionador (MONQUEIRO et al. 2000).

Os dois parâmetros de utilização de doses de herbicidas, são problemáticos no aspecto resistência, o uso de alta dose, muito acima da dose recomendada, seleciona plantas que são extremamente resistentes, com alto fator de resistência, (VENCILL et al. 2012). Baixas doses são responsáveis por selecionar plantas daninhas com maior capacidade de metabolização de herbicidas. Em trabalho realizado por Neve e Powles (2005), utilizando subdoses de herbicidas, observou esse impacto sobre a resistência das plantas daninhas. Esse estudo incidiu em selecionar as plantas sobreviventes com subdoses e aplicar posteriormente a dose padrão nas plantas selecionadas, o que lhes permitiu perceber que essa seleção de plantas gerou aumento significativo no fator de resistência conforme mais subdoses do herbicida são aplicadas na mesma planta, e a seleção de plantas daninhas com mecanismo de resistência baseado na metabolização.

A resistência devido a uma mutação é específica e pode levar desde a perda de um único herbicida até mesmo à perda de todo um mecanismo de ação. No caso da resistência de herbicida causada por mecanismos que envolvem a metabolização de herbicidas, a chance de ocorrência de resistência múltipla é muito superior, isso ocorre devido a planta já possuir o mecanismo para a metabolização de herbicidas, agindo sobre diferentes moléculas, por não apresentar especificidade (COMONT et al., 2020).

A genética das plantas daninhas tem também uma grande influência na resistência de plantas daninhas a herbicidas, sendo a variabilidade genética da população, um fator

indispensável numa espécie suscetível para que seja possível ocorrer evolução de biótipos resistentes a herbicidas (VIDAL; FLECK, 1997). A frequência inicial de plantas resistentes na população é fator importante a ser considerado. Inibidores da ALS representam a maior frequência inicial de resistência, fazendo, desse modo, com que a possibilidade de seleção de biótipos resistentes seja superior. Quanto a alelos para ser resistente, a resistência sendo dominante é a mais problemática, porque mutante com alelo de resistência dominante apresenta condições de deixar como descendentes indivíduos resistentes, independentemente do tipo de fecundação da espécie (VIDAL; FLECK, 1997).

A resistência genética também é influenciada pela quantidade de mutações necessárias para a ocorrência de resistência. No caso dos inibidores de ALS, apenas uma mutação na enzima pode gerar resistência a todos os herbicidas do grupo, sendo de mais fácil ocorrência que resistência aos inibidores da EPSPS (YU et al. 2015)

Eberlein et al. (1997) verificaram que tanto a localização da mutação no gene quanto a substituição específica de um aminoácido na enzima afetaram a estrutura e a função da ALS e, assim, reduziram a possibilidade de ligação do herbicida. Nesse trabalho, os autores obtiveram 57% de diferenças na atividade da enzima entre biótipos resistentes e suscetíveis de *Lactuca serriola*, sendo o biótipo R o que teve os maior atividade enzimática. No entanto, a comparação da atividade relativa da ALS não revelou diferenças significativas entre biótipos resistentes e suscetíveis em *Xanthium strumarium* (LEE & OWEN, 2000)

De acordo com Christoffoleti et al. (2000) qualquer população em que os indivíduos apresentem uma base genética variável quanto à tolerância a uma medida de controle irá, com o tempo, mudar sua composição populacional como mecanismo de fuga para sobrevivência, diminuindo a sensibilidade a esta medida de controle. O sistema de plantio direto foi um dos agentes que no início proporcionou bom controle das plantas daninhas que estavam adaptadas ao sistema convencional, sendo principalmente as espécies perenes, que se adaptaram neste sistema, por possuírem estruturas de reserva e também .

Nas últimas décadas as plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS têm-se tornado um problema crescente em vários países. Apenas cinco anos após a liberação comercial do herbicida chlorsulfuron, já foi relatado o primeiro caso registrado de resistência, Mallory-Smith et al. (1990) e Primiani et al. (1990), que identificaram biótipos resistentes de *Lactuca serriola* e *Kochia scoparia* em áreas cultivadas por trigo nos Estados Unidos a inibidor de ALS.

Segundo informações da Heap (2021), atualmente tem-se 162 espécies resistentes a inibidores da ALS, sendo várias com resistência múltipla. Para *R. raphanistrum*, tem-se

atualmente 10 casos de resistência registrados sendo o mais prejudicial documentado na Austrália, no ano de 2010, por envolver resistência a cinco grupos de herbicidas: inibidores da ALS, Fotossistema II, inibidor de PDS (Phytoene desaturase), inibidores da HPPD (4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) e auxinas sintéticas (HEAP, 2020). Segundo Walsh; Duane e Powles (2001), em uma pesquisa aleatória conduzida em áreas de produção de trigo na Austrália revelou que 21% das populações de nabiça eram resistentes a inibidores de ALS.

O primeiro caso de resistência de planta daninha no Brasil, foi registrado com o picão-preto (*Bidens pilosa*), em 1993 (CHRISTOFFOLETI, 1993), sendo resistente aos herbicidas inibidores da ALS. Atualmente no Brasil foram confirmados 30 casos de resistência de plantas daninhas a este mecanismo de ação (HEAP, 2021).

A Acetolactato Sintase é a primeira enzima comum a biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina, responsável pela síntese de acetolactato, acetohidroxiutarato. Cinco classes químicas de herbicidas comerciais inibem a ALS: sulfoniluréia (SU), imidazolinonas (IM), triazolopirimidina (TP), pirimidiniltiobenzoatos (PTB) e sulfonilaminocarboniltriázolinonas (SCT).

2.4 Mecanismos de resistência a herbicidas inibidores da ALS

Dois mecanismos principais conferem resistência aos herbicidas inibidores da ALS, em vários casos a resistência é devido a redução da sensibilidade da enzima alvo, que ocorre devido às várias mutações no gene que codifica a enzima ALS. Também pode ocorrer a super-expressão da enzima alvo do herbicida; no caso dos inibidores de ALS, não foram documentados, apenas foi encontrada em linhagem de milho e *Sisymbrium orientale* diferenças na atividade da enzima ALS (FORLANI et al., 1991).

Na maioria das espécies, a resistência é genética, podendo atingir muitas plantas e, assim, ser propagada rapidamente. Em espécies alógamas, existe maior probabilidade de ocorrência de múltiplos mecanismos de resistência, pois a polinização cruzada permite maior recombinação gênica (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2016). A diversidade genética é de fundamental importância no desenvolvimento da resistência, conferindo resistência a uma classe de herbicidas antes mesmo da aplicação no campo. Isso é possível porque essas mutações gênicas estão presentes aleatoriamente nas populações de plantas, sendo perceptível a partir da seleção realizada através da aplicação de um determinado herbicida. (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003)

Fatores ligados a genética e biologia da planta daninha tem papel importante na evolução da resistência a herbicidas. Estudos sobre a herança genética da resistência, causada por sítio de ação alterado, indicam que a resistência é controlada por um gene nuclear (YU; POWLES, 2014a).

Os mecanismos não relacionados a local de ação (*Non Target Site Resistance-NTSR*), envolvem a metabolização e o impedimento que o herbicida chegue ao local de ação alvo, é normalmente controlada por mais de um gene, envolve uma série de enzimas e processos que atuam na redução da ação fitotóxica do herbicida na planta (DÉLYE, 2012)

O mecanismo NTSR é obtido com a redução da concentração de herbicida que atinge o local alvo, que incluiu mecanismos de aumento de metabolização e sequestro de herbicidas, penetração reduzida e translocação limitada (POWLES; YU, 2010). A maioria dos NTSR que envolve a resistência metabólica é causada por citocromo P450 monooxigenases (P450s), glutatona s-transferases (GSTs) e glicosiltransferases (GTs), que são as enzimas responsáveis pela alteração da molécula herbicida, fazendo que ela deixe de ter a função (YU; POWLES, 2014a).

A resistência devido ao aumento do metabolismo do herbicida ALS até agora foi relatada em *Alopecurus myosuroides* e em várias outras espécies (MENENDEZ et al. 1997). A metabolização por ação de enzimas do complexo GST foi relatada em biótipo com origem no sul do Brasil em *Echinochloa crus-galli* (DALAZEN, MARKUS; MEROTTO JR., 2018). Em *Lolium rigidum*, também foi confirmada a resistência envolvendo metabolização, com ação das enzimas do complexo P450, que são as principais enzimas responsáveis pelo início da degradação de herbicidas em biótipos de plantas daninhas (HAN et al., 2014). Em *Descurainia sophia*, também foram reportados mecanismos envolvendo a metabolização e herbicidas, as enzimas do complexo P450 (YANG et al. 2018). Zhang et al. (2021) também encontrou resistência envolvendo P450 em biótipo de *Capsella bursa-pastoris* na China, esse tipo de metabolização é avaliada com a utilização do bloqueador da enzima, caso a mesma seja bloqueada e ocorra controle, a metabolização faz parte do mecanismo. Já foram reportados casos em *Sinapis arvensis* e *Echinochloa phyllopogon*, baseados em metabolização de herbicidas (IWAKAMI et al. 2013) Resistência múltipla devido a ambos os mecanismos, enzima ALS mutada e aumento da taxa de metabolização do herbicida ALS vem sendo reportados (HEAP, 2021).

A resistência a herbicidas em plantas também pode ocorrer em função de mutações no DNA, com alteração de aminoácidos no centro de reação da enzima alvo dos herbicidas,

impedindo a ligação eficaz do herbicida com a enzima, esse mecanismo de resistência é relacionado a alteração no sítio de ação (TSR) (POWLES; YU, 2010).

Em muitos casos, a resistência evoluiu devido à redução na sensibilidade do local alvo conferida por uma das várias mutações no gene ALS (YU et al. 2003). Uma pesquisa aleatória em larga escala em 10 milhões de hectares de áreas agrícolas australianas revelou uma ampla distribuição e diversidade de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em *R. raphanistrum*. Muitas populações resistentes exibem diversas mutações no gene ALS, alterando a conformação do sítio de ação dos herbicidas na enzima. Identificou-se em populações de *R. raphanistrum* uma mutação na Ala-122-Tyr que confere alto nível e ampla resistência aos inibidores da ALS (Yu et al, 2003). Várias mutações já foram identificadas na enzima ALS conferindo resistência genética, , por exemplo, troca de prolina da posição-197 por serina, ácido aspartico-376 por ácido glutâmico e tirosina-574 por leucina (YU, et al, 2012).

O polimorfismo de nucleotídeo único resultou em duas substituições de aminoácidos: uma única alteração de códons CCT para ACT, levando a uma substituição Pro-197-Thr e uma dupla alteração dos códons GCT para TAT, originando substituição de Ala-122-Tyr, causando elevada resistência de *R. raphanistrum* aos herbicidas inibidores da ALS (HAN et al., 2012). A substituição de aminoácidos específicos no gene da ALS confere níveis de resistência diferenciados aos herbicidas. A substituição Trp-574 para Leu resulta em altos níveis de resistência aos inibidores da ALS. Em contraste, substituições na Pro-197 resulta em elevado nível de resistência à sulfoniluréia e sulfanilamida e baixa ou nenhuma resistência aos herbicidas do grupo químico imidazolinonas (POWLES; YU, 2010).

Em *R. raphanistrum* L. e *R. sativus* L. a mudança estrutural na enzima alvo é a forma mais comum de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. As alterações dos aminoácidos Pro197Leu, Ala, His e Ser; Trp574 para Leu; Ala122 para Tyr e Asp376 para Glu já foram relatadas em *R. raphanistrum* como causas da resistência a este grupo de herbicidas (YU et al., 2012).

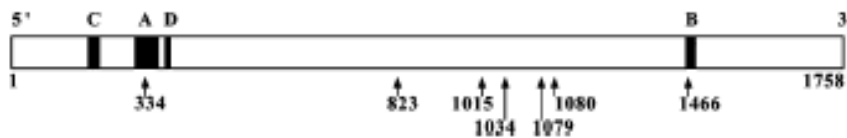
Uma das formas de avaliar as propriedades bioquímicas de uma enzima é verificando a sua afinidade pelo substrato. A afinidade pelo substrato piruvato, medido como Km (concentração de substrato que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima da reação), foi similar entre biótipos resistentes e suscetíveis nas espécies *Brassica tournefortii* e *Sisymbrium orientale* (BOUTSALIS; KAROTAM; POWLES, 1999). Contudo, na espécie *S. orientale*, a velocidade máxima da reação no biótipo resistente foi maior do que no suscetível. No entanto, experimentos utilizando a técnica de hibridação *Northern blot*, conduzidos com plantas sensíveis e resistentes, falharam em mostrar diferenças substanciais entre duas

linhagens, indicando que a tolerância não era devida à superexpressão da enzima-alvo (DEWAELE et al., 1997).

Estratégias de manejo químico para biótipos resistentes a herbicidas podem ser realizadas através do uso de herbicidas com diferentes mecanismos de ação ou através da associação de herbicidas com mecanismos distintos (POWLES; YU, 2010). O manejo integrado e a associação de vários métodos de controle, são considerados eficazes no controle da resistência e contribuem também para evitar o surgimento de novos casos de resistência. (PIASECKI et al., 2019)

Segundo Tan e Medd (2002), os principais pontos de mutações que se encontram na enzima ALS, compreendem sete posições (Figura 1), compreendem os domínios A,B,C,D e, ainda segundo Yu e Powles (2014b), já foram elucidados e percebidos, 24 pontos para possíveis mutações, cada mutação gera um resultado diferente isso se deve aos pontos possíveis a ligação dos herbicidas.

Figura 1 – Diagrama esquemático da sequência do gene ALS (5' 3') de *R. raphanistrum*. As caixas sombreadas, C (nt 88/144), A (nt 316/354), D (nt 358/375) e B (nt 1465/1476) representam quatro domínios altamente conservados do gene ALS. As posições dos sete polimorfismos de nucleotídeos (ou mutações) observadas em sequências de ALS de *R. raphanistrum* examinadas que resultaram em substituições de aminoácidos na enzima estão marcadas pelas setas.



Fonte: Tan e Medd (2002)

Atualmente, no Brasil, segundo Heap (2021_) foi reportado um caso de resistência de *Raphanus raphanistrum* a inibidores de ALS, oriundo do Norte do Paraná, mas além deste, existem trabalhos que comprovam a resistência em Cafelândia segundo Costa (2013), que desenvolveu trabalhos de dose resposta com biótipo da região.

2.5 Custo ecológico da resistência de plantas daninhas a herbicida

O custo ecológico da resistência é quando ela leva o biótipo a sofrer alguma alteração na sua biologia, resultando em uma desvantagem ecológica em relação à população não resistente da espécie (HENCKES et al., 2019). Dessa maneira ela pode até mesmo ser suprimida

por uma planta suscetível e apresentar por exemplo baixo crescimento, na ausência da aplicação do herbicida.

A capacidade de sobrevivência e reprodução de um biótipo em uma população determina a sua adaptabilidade ecológica, a qual depende de características biológicas, como taxas de germinação, crescimento e produção de sementes (CHRISTOFFOLETI, 2001). A adaptabilidade ecológica entre biótipos resistentes e suscetíveis tem sido comparada através da análise de crescimento de plantas daninhas em condições competitivas entre biótipos, em plantas isoladas e em condições de competição interespecífica entre plantas daninhas e cultivadas (TREZZI; VIDAL, 2000). A hipótese de que biótipos resistentes a herbicidas possuem menor habilidade competitiva do que biótipos suscetíveis surgiu da observação em biótipos resistentes aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das triazinas, os quais apresentam menor taxa de crescimento e capacidade reprodutiva em relação aos biótipos suscetíveis, na ausência do herbicida (JASIENIUK; BRULÉ-BABEL; MORRISON, 1996). Para os biótipos de plantas daninhas resistentes às triazinas, a mutação que resulta em única alteração na proteína D1 do fotossistema II reflete em efeitos pleiotrópicos no biótipo resistente, alterando sua eficácia fotossintética (DEKKER, 1997). Em condições não-competitivas, não foram constatadas diferenças na massa da parte aérea de *Kochia scoparia* entre biótipos resistentes e suscetíveis aos inibidores de ALS (CHRISTOFFOLETI et al., 1997).

Um dos princípios básicos da genética evolutiva é de que a adaptação a um novo ambiente, com a presença de um agente seletor, geralmente trará efeitos negativos aos agentes selecionados, conhecido também como “custo adaptativo” (STRAUSS et al., 2002).

A diversidade de trabalhos envolvendo a comparação entre biótipos resistentes e suscetíveis é grande, a maior parte desses estudos mostra prejuízo para o biótipo R em relação ao S (LEBARON & GRESSEL, 1982). No entanto, estudos recentes têm evidenciado que biótipos de plantas daninhas resistentes a outros grupos químicos de herbicidas, como as sulfoniluréia e imidazolinonas (inibidores da ALS), não apresentam diferenças de adaptabilidade entre os biótipos R e S (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009)

Quando a alteração de um alelo que confere resistência também implica em custo adaptativo, segundo Vila-Aiub; Neve; Powles (2009), há pelo menos três explicações para a sua origem: (a) o custo adaptativo resulta de uma nova mutação no sítio de ação em que o herbicida atua, e essa mutação também compromete ou interfere, em algum nível, com o funcionamento normal do metabolismo da enzima (COHAN; KING; ZAWADZKI, 1994). Por exemplo, uma simples substituição em um aminoácido pode causar uma modificação estrutural na enzima, tornando a planta insensível ao herbicida, porém essa mudança estrutural também

afeta as funções catalíticas da enzima, como a afinidade pelo substrato (POWLES; PRESTON, 2006). (b) A resistência é, de certa forma, um mecanismo de defesa da planta em resposta à ação dos herbicidas, e esse mecanismo pode comprometer o direcionamento de reservas para a produção de massa seca e órgãos reprodutivos, segundo a teoria da “fonte-dreno” (HERMS; MATTSON, 1992). Por exemplo, a resistência devido ao metabolismo do herbicida por plantas pode, em alguns casos, ser devido a uma maior produção de enzimas do complexo P450 (WERCK- REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000). Assim, a maior produção dessas enzimas causaria um custo adicional de energia que seria “tirado” dos órgãos reprodutivos e do crescimento, causando o custo adaptativo. (c) Por fim, o custo adaptativo pode ser causado por consequência de alterações nas interações ecológicas dos indivíduos (STRAUSS et al., 2002). Se um alelo possui efeito pleiotrópicos, onde este ao mesmo tempo regula algum fenótipo atrativo a polinizadores, resistência a doenças e resistência a herbicidas, estes indivíduos terão a capacidade de sobreviver após a exposição a herbicidas, porém terão outras desvantagens ecológicas (SALZMANN; HANDLEY; MUELLER-SHARER; 2008).

Existem casos em que o custo adaptativo pode não apenas só provocar redução no desenvolvimento da planta. No caso de plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS, existem casos em que a mutação do sítio de ação causa diminuição (ASHIGH; TARDIF, 2007), aumento (YU et al., 2010) e indiferença quanto ao custo adaptativo (PRESTON et al., 2006).

Segundo Preston e Powles (2002), os alelos que conferem resistência a plantas daninhas e que carregam maiores custos adaptativos são menos comuns do que aqueles que carregam menores custos adaptativos dentro de uma população. Ainda segundo os autores, geralmente os genes que conferem resistência a herbicidas são raros dentro de uma população quando não existe o agente selecionador herbicida, muito provavelmente devido ao custo adaptativo que esses genes conferem às plantas daninhas.

Goggín et al. (2019), realizaram um estudo para verificar a possibilidade de custo ecológico da resistência de 2,4-D em *R. raphanistrum*, oriundos da Austrália Ocidental, concluiu que apesar da menor biomassa de populações resistentes, não houve comprometimento na produção de sementes, portanto, espera-se que indivíduos de *R. raphanistrum* resistentes ao 2,4-D, encontrados no cinturão de grãos da Austrália Ocidental, não diminuam sua frequência em relação aos suscetíveis, se o uso de 2,4-D for interrompido.

Em inibidores de ALS, Tardiff, Rajcan e Costea. (2005) indicaram que vários biótipos de *Amaranthus powelli* resistentes, com uma substituição de Trp-574-Leu exibiu lento desenvolvimento, biomassa reduzida e área foliar e distorção das folhas em relação aos biótipos susceptíveis a inibidores da ALS.

Estudo realizado por Li et al. (2012), mostrou que na ausência ou na presença de competição de recursos, a resistência do gene ALS através de mutações de troca de bases, Ala-122-Tyr, Pro-197-Ser, Asp-376-Glu e Trp-574-Leu não impõe efeitos pleiotrópicos negativos em crescimento vegetativo de *R. raphanistrum* em plantas resistentes e suscetíveis.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D. et al. **Manejo de Plantas Daninhas**. 2008. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1022693/1/CNPTID43073.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.
- AGOSTINETTO, D. et al. Período crítico de competição de plantas daninhas com a cultura do trigo. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p.271-278, 2008.
- AMBROSI, I. et al. **Aspectos econômicos da cadeia produtiva de trigo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 108p. (Embrapa Trigo. Documentos, 15).
- ASHIGH, J.; TARDIF, F. J. An Ala-205-Val substitution in acetohydroxyacid synthase of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science**, v. 55, n. 6, p. 558-565, 2007.
- BARROSO, A. A. M.; YAMAUTI, M. S.; ALVES, P. L. C. A. Interferência entre espécies de planta daninha e duas cultivares de feijoeiro em duas épocas de semeadura. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 609-616, 2010.
- BIANCHI, M. A. et al. Papéis do arranjo de plantas e do cultivar de soja no resultado da interferência com plantas competidoras. **Planta Daninha**, v.28, p.979- 991, 2010.
- BRIGHENTI, A.M. et al. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do girassol. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p.251-257, 2004.
- BRUNHARO, C. A. C. G. et al. Aspectos do mecanismo de ação do amônio glufosinato: culturas resistentes e resistência de plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 2, p. 163, 2014.
- BOUTSALIS, P.; KAROTAM, J.; POWLES, S. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. **Pesticide Science**, v. 55, n. 5, p. 507-516, 1999.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.) **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p. 179-202.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4. ed. Piracicaba: Embrapa, 2016. Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas - HRAC-BR.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, p. 3-22. 2004.
- CHRISTOPHER, J.T.; POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. Resistance to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*) Involves at Least Two Mechanisms. **Plant Physiology**, v. 100, n. 4, p.1909-1913, 1992.

- CHRISTOFFOLETI, P. J. Análise comparativa do crescimento de biótipos de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 19, n. 1, p. 75-83, 2001.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 507-515, 2003.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; WESTRA, P.; MOORE, F. Growth analysis of sulfonylurea-resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, v. 45, n. 5, p. 691- 695, 1997.
- CHEAM, A. H. CODE, G. R. The biology of Australian weeds 24, Wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). **Plant Protection** v.10 n1, p. 2–13, 1995.
- COHAN, F.M.; KING, E.C.; ZAWADZKI, P. Amelioration of the deleterious pleiotropic effects of an adaptive mutation in *Bacillus subtilis*. **Evolution**, v. 48, p. 81–95, 1994.
- COMONT, D. et al. Evolution of generalist resistance to herbicide mixtures reveals a trade-off in resistance management. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2020.
- COSTA, L. O. **Elucidação do mecanismo de resistência de *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS)**. 2017. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, UPF, Passo Fundo, 2017.
- COSTA, L. O. **Resistência de *Raphanus raphanistrum* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS)**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, UPF, Passo Fundo, 2013.
- DALAZEN, G.; MARKUS, C.; MEROTTO JUNIOR, A. Differential expression of genes associated with degradation enhancement of imazethapyr in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 9, p. 389-401, 2018.
- DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2012.
- DEWAELE, E. et al. Biochemical characterization of chlorsulfuron resistance in *Cichorium intybus* L. var. Witloof. J. **Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 109-114, 1997.
- DEKKER J. Weed diversity and weed management. **Weed Science**, v. 45, n. 3, p. 357-363, 1997.
- EBERLEIN, C. V. et al. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1997.
- FERREIRA, E.A. et al Estudos anatômicos de folhas de plantas daninhas: I - *Nicandra physaloides*, *Solanum viarum*, *Solanum americanum* e *Raphanus raphanistrum*. **Planta Daninha**, v. 20, n. 2, p. 159-167, 2002.

FORLANI, G. et al. Chlorsulfuron tolerance and acetolactate synthase activity in corn (*Zea mays L.*) inbred lines. **Weed Science**, v. 39, n. 4, p.553-557, 1991.

FRAGA, D. S. **Resposta de *Lolium multiflorum L.* aos herbicidas inibidores da enzima ACCase**. 2012. 77 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas.

GOLDBERG D.E; LANDA K. Competitive effect and response: Hierarchies and correlated traits in the early stages of competition. **Journal Ecology**, v. 79, n. 1, p. 1013-1030, 1991.

GOGGIN, D. E. et al. No auxinic herbicide–resistance cost in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Science**, v. 67, n. 05, p.539-545, 2019.

HAN, H. 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**, v. 68, n. 8, p.1164-1170, 2012.

HAN, H. *et al.* Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. **Crop Protection**, v. 65, p. 57-63, 2014.

HASHEM, A. et al. Resistance of Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in the Western Austrália Wheat Belt. **Weed Technology**, v. 15, n. 1, p.68-74, 2001.

HASHEM, A.; WILKINS, N. THIRTEENTH AUSTRÁLIAN WEEDS CONFERENCE, 2002, Austrália. **Competitiveness and persistence of wild radish (*Raphanus raphanistrum L.*) in a wheat-lupin rotation**. Perth, Wa, Austrália.: Papers and Proceedings (eds H Spafford Jacobs, J Dodd & Jh Moore), 2002. 3 p.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. 2021. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/>>. Acesso em: 20 fev. 2021

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. 2019. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/>>. Acesso em: 20 set. 2019

HENCKES, J.R. et al. Fitness Cost and Competitive Ability of Ryegrass Susceptible and with Multiple Resistance to Glyphosate, Iodosulfuron-Methyl, and Pyroxsulam. **Planta Daninha**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2019.

HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**, v. 67, p. 283–335, 1992.

HOVICK, J.M. et al. Hybridizations alters early life-history traits and increases plant colonization success in a novel region. **The American Naturalist**, v.179. n. 2 p. 192-203, 2012.

IAPAR - INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Informações técnicas para a cultura do trigo no Paraná - 2002**. 222. ed. Londrina, 2002. 181 p.

- IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014.
- JASIENIUK, M.; BRULÉ-BABEL, A. L.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, n. 2, p. 176-193, 1996.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II, 2 ed. São Paulo: Basf Brasileira, 1999, 978 p.
- LAMEGO, F.P. *et al.* Habilidade competitiva de cultivares de trigo com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p.521-531, 2013.
- LI, M. *et al.* ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p.689-695, 2012.
- LEE, J. M.; OWEN, M. D. K. Comparison of acetolactate synthase enzyme inhibition among resistant and susceptible *Xanthium strumarium* biotypes. **Weed Science**, v. 48, n. 3, p. 286-290, 2000.
- LeBARON, H.M.; GRESSEL, J. Summary of accomplishments, conclusions, and future needs. In: LeBARON, H.; GRESSEL, J. (Ed.) **Herbicide resistance in plants**. New York: John Wiley and Sons, 1982. p.349-362.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 6. Ed. Nova Odessa: Plantarum, 2006. 339 p.
- MACIEL, C. D. G.; MORAES, D. W.; BALAN, M. G. Associação de adjuvantes com herbicidas na dessecação e no controle em pós-emergência de plantas daninhas na cultura do trigo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 3, p. 243, 2011.
- MALDANER, R. L.; SCHENEIDER, T. Seletividade do herbicida saflufenacil ao trigo. **Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 47-54, 2019.
- MALLORY-SMITH, C.A., THILL, D.C., DIAL, M.J. Identification of sulfonylurea herbicide resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, v.4, p.787-790, 1990.
- MAPA. **AGROFIT - sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2021. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 24 fev. 2021.
- MARCHIORO, V. S.; FRANCO, F. A. **Informações técnicas para trigo e triticales - safra 2011**. Cascavel, Coodetec. Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales, 2010, 170 p.
- MENENDEZ, J.M.; PRADO, R. de; DEVINE, M. D. Chlorsulfuron cross-resistance in a chlorotoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. **The British Crop Protection Council**, v. 1, n. 1, p.319-328, 1997.

MONQUEIRO, P.A. et al. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p.419-425, 2000.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Manejo de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 19, n. 1, p. 67-74, 2001.

NEVE, P.; POWLES, S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1154-1166, 2005.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INQUE, M. H. **Biologia e Manejo de Plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. 362 p.

PIASECKI, C. et al. Glyphosate Resistance Affect the Physiological Quality of *Conyza bonariensis* seeds. **Planta Daninha**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2019.

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

POWLES, S. B.; PRESTON, C. **Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants**. South Austrália: HRAC Global, 2015. Disponível em: <<https://www.hracglobal.com/files/Herbicide-Cross-Resistance-and-Multiple-Resistance-in-Plants.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2019.

POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, v. 20, p. 282– 289, 2006.

PRESTON, C.; STONE, L.M.; RIEGER, M.A.; BAKER, J. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 84, p. 227-235, 2006.

PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate-synthase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 88, p. 8–13, 2002.

PRIMIANI, M.M., COTTERMAN, J.C., SAARI, L.L. Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicide. **Weed Technology**, v.4, p.169-172, 1990.

RIZZARDI, M.A. et al. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 149-158, 2002.

SALZMANN, D.; HANDLEY, R.J.; MUELLER-SCHARER, H. Functional significance of triazine-herbicide resistance in defence of *Senecio vulgaris* against a rust fungus. **Basic Applied Ecology**, v. 9, p. 577-587, 2008.

SAHLI, H.F; et al. Adaptive differentiation of quantitative traits in the globally distributed weed, wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Genetics**, v. 180, n. 2, p.945-955, 2008.

- SHANER, D. L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection, and management. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 44, n. 4, p.405-411, 1999.
- SCHAFFRATH, V. R. et al. Variabilidade espacial de plantas daninhas em dois sistemas de manejo de solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 53-60, 2007.
- STRAUSS, S. Y. et al. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 6, p. 278-285, 2002.
- STREIBIG, J. C. et al. Estimation of thresholds for weed control in Australian cereals. **Weed Research**, v. 29, n. 2, p.117-126, 1989.
- SOUZA, J.R.P.; MACHADO, J.R.; VELINI, E.D. Crescimento de *Brachiaria plantaginea* e *Raphanus raphanistrum* em convivência com híbridos de milho submetidos a períodos de controle das plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, p. 209-215, 2001.
- TAN, M.K; MEDD, R.W. Characterization of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 195-205, 2002.
- TARDIF, F. J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. **New Phytologist**, v. 169, n. 2, p.251-264, 2005.
- 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 Herbicidas** v. 1, n. 3, p. 255-260, 2000.
- VIDAL, R. A.; FLECK, N. C. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta daninha**, v. 15, n. 2, p. 152-161, 1997.
- VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 751-767, 2009.
- VILA-AIUB, M. M. et al. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. **Planta**, v. 239, n. 4, p.793-801, 2014.
- VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, p. 751-767, 2009.
- VENCILL, W. K et al. Herbicide Resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 60, n. 1, p. 2-30, 2012.
- VARGAS, L et al. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa-Mg: Jard, 1999. 131 p.

- WANDSCHEER, A. C. D.; PASTORINI, L. H. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 949-953, 2008.
- WARWICK, S. I; FRANCIS, A. The biology of Canadian weeds. 132. *Raphanus raphanistrum* L. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, n. 3, p.709-733, 2005.
- WALSH, M. J.; DUANE, R. D.; POWLES, S. B. High frequency of chlorsulfuron-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations across the Western Australian Wheatbelt. **Weed Technology**, v. 15, n. 2, p.199-203, 2001.
- WALSH, M. J. et al. Multiple-herbicide resistance across four modes of action in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Science**, v. 52, n. 1, p.8-13, 2004.
- WALSH, M J; OWEN, M J; POWLES, S B. Frequency and distribution of herbicide resistance in *Raphanus raphanistrum* populations randomly collected across the Western Australian wheatbelt. **Weed Research**, v. 47, n. 6, p. 542-550, 2007.
- WERCK-REICHHART, D; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000.
- YANG, Q. et al. Metabolic Resistance to Acetolactate Synthase Inhibiting Herbicide Tribenuron-Methyl in *Descurainia sophia* L. Mediated by Cytochrome P450 Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 17, p. 4319-4327, 2018.
- YU, Q.; POWLES, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p.1340-1350, 2014 a.
- YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, v. 166, n. 3, p. 1106-1118, 2014 b.
- YU, Q. et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1440-1447, 2015.
- YU, Q. et al. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science**, v. 51, n. 6, p.831-838, 2003.
- YU, Q. et al. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed Research**, v. 52, n. 2, p.178-186, 2012.
- YU, Q. et al. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 14, p.3925-3934, 2010.
- ZAGONEL, J. **Eficácia do herbicida Hussar (iodosulfuron methyl sodium) no controle de plantas daninhas na cultura do trigo**. Londrina: Embrapa Soja/iapar, 2005. 3 p. REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICA

ZHANG, X. et al. Investigating the mechanism of metabolic resistance to tribenuron-methyl in *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. by full-length transcriptome assembly combined with RNA-Seq. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 12, p. 3692-3701, 2021.

4 RESISTÊNCIA CRUZADA E MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE NABIÇA A HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS

4.1 RESUMO

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é cada vez mais presente no campo, a comprovação e elucidação dos casos de resistência é muito importante para a adoção de um manejo efetivo. Objetivo desse trabalho foi comprovar a resistência cruzada de um biótipo de nabiça a herbicidas inibidores da ALS, por meio de ensaio de dose resposta, em duas gerações, e também elucidar o mecanismo de resistência. A pesquisa foi desenvolvida em casa de vegetação, onde foram testados três herbicidas inibidores de ALS, metsulfuron-methyl (sulfonilureia), imazethapyr (imidazolinona) e pyroxsulam (triazolopirimidina), em doses crescentes, sendo a dose recomendada de 3,96; 106,0 e 15,3 g. ia ha⁻¹, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos com dois biótipos, em duas gerações F1 e F2. Foi avaliada a porcentagem de controle aos 21 dias após a aplicação em F1 e aos 28 dias após a aplicação em F2. Para avaliação do mecanismo de resistência, foram desenvolvidos dois trabalhos, um buscando verificar a presença de mutação e outro a existência de metabolização de herbicidas, por meio de metodologias já descritas na literatura. A análise dos dados compreendeu análise de variância e análise de regressão não-linear. Para avaliação da mutação, foram realizadas análises através de programa de bioinformática. Para o biótipo resistente na geração F1, foram obtidos Fator de resistência (FR₂₅) de 220, 388 e 706 para metsulfuron-methyl, imazethapyr e pyroxsulam, respectivamente. Em F2, o FR₅₀ foi de 1516, 59 e 247 para metsulfuron-methyl, imazethapyr e pyroxsulam, respectivamente. Foi encontrada uma mutação na posição Trp574Leu, a qual já foi elucidada para resistência cruzada, no ensaio de dose resposta, não se obteve a metabolização de herbicidas por enzimas do complexo P450. Dessa forma, confirmou-se a resistência cruzada do biótipo de nabiça aos herbicidas inibidores de ALS.

Palavras-chave: Controle químico, dose resposta, trigo, mutação, *Raphanus raphanistrum*.

4.2 ABSTRACT

The resistance of weeds to herbicides is increasingly present in the field, the proof and elucidation of cases of resistance is very important for the adoption of an effective management. The objective of this work was to prove the cross-resistance of a wild radish biotype to ALS-inhibiting herbicides, through a dose-response assay, in two generations, and also to elucidate the mechanism of resistance. The research was carried out in a greenhouse, where three ALS-inhibiting herbicides were tested, metsulfuron-methyl (sulfonylurea), imazethapyr (imidazolinone) and pyroxsulam (triazolopyrimidine), in increasing doses, with the recommended dose being 3.96; 106.0 and 15.3 g. ai ha⁻¹, respectively. The experiments were carried out with two biotypes, in two F1 and F2 generations. The percentage of control was evaluated 21 days after application in F1 and 28 days after application in F2. To evaluate the resistance mechanism, two studies were carried out, one seeking to verify the presence of mutation and the other the existence of herbicide metabolization, using methodologies already described in the literature. Data analysis comprised analysis of variance and non-linear regression analysis. To evaluate the mutation, analyzes were performed using a bioinformatics program. For the resistant biotype in the F1 generation, resistance factors (RF25) of 220, 388 and 706 were obtained for metsulfuron-methyl, imazethapyr and pyroxsulam, respectively. In F2, the RF50 was 1516, 59 and 247 for metsulfuron-methyl, imazethapyr and pyroxsulam, respectively. A mutation at position Trp574Leu, which has already been elucidated for cross-resistance, was found in the dose-response assay, but no metabolization of herbicides by enzymes of the P450 complex was achieved. Thus, the cross-resistance of wild radish biotype to ALS-inhibiting herbicides was confirmed.

Keywords: Chemical control, dose response, wheat, mutation, *Raphanus raphanistrum*.

4.3 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas que infestam as plantações são uma ameaça à produtividade das principais culturas agrícolas. O controle químico é altamente eficaz para controlar plantas daninhas em muitos cultivos e atualmente é a principal tecnologia utilizada. No entanto, como resultado da dependência do uso de herbicidas e da exposição de grandes populações de plantas daninhas a esses pesticidas, ocorreu uma evolução contínua e ampla de populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas (HEAP, 2014).

A alta variabilidade genética, tolerância ao estresse, rápido desenvolvimento e elevada produção de sementes contribuem para a ocorrência de plantas daninhas e adaptação em diferentes culturas e sistemas de cultivo. O *Raphanus raphanistrum* é uma planta indesejada nas áreas agrícolas, com grande impacto econômico na região Sul do Brasil, além de causar interferência direta às culturas e hospedeira de pragas, patógenos e nematoides (AGOSTINETTO et al., 2020). Além disso, mesmo em baixa densidade pode reduzir significativamente a produtividade das culturas (YAMAUTI; ALVES; CARVALHO, 2011).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é o principal problema atual no controle de plantas daninhas, diversos casos foram reportados e os mecanismos de resistência estão sendo elucidados. O conhecimento da resistência é uma importante ferramenta para auxiliar o manejo das plantas daninhas resistentes, assim elabora-se melhores alternativas para o seu manejo, compreende-se a origem da resistência e a variabilidade genética das plantas daninhas (VARGAS et al., 2011).

Quanto aos herbicidas inibidores da enzima ALS, atualmente tem-se 656 casos reportados em todo o mundo, cerca de 160 espécies são resistentes a esses herbicidas, sendo o grupo com maior quantidade de casos de resistência confirmados (HEAP, 2021). No Brasil atualmente, 30 casos de resistência a inibidores de ALS foram reportados. Costa (2013) e Costa e Rizzardi (2014) comprovaram a resistência de *R. raphanistrum* ao herbicida metsulfuron-methyl, com um biótipo oriundo do Norte do PR. Cechin et. al (2016), confirmaram a resistência de biótipos de *R. sativus* ao iodosulfuron, oriundos de Três de Maio - RS. Em outro trabalho Cechin et al. (2017) comprovaram a resistência cruzada a inibidores de ALS em um biótipo de *R. sativus* oriundo do Noroeste do RS. Recentemente Costa et al. (2021), confirmaram a resistência de biótipos de *R. sativus* e *R. raphanistrum* oriundos de Cafelandia - PR, Júlio de Castilhos - RS e Cruz Alta - RS.

Na argentina, Pandolfo et al. (2013), confirmaram a resistência de *R. sativus* a inibidores de ALS, com biótipo oriundo de uma população natural, aos grupos químicos imidazolinona e

sulfonilureia. Na Austrália, em trabalho sobre levantamento de resistência de *R. raphanistrum* a herbicidas, Owen; Martinez e Powles (2015) verificaram que apenas 18 % dos biótipos do estado do Oeste, principal estado produtor de trigo do país, apresentam suscetibilidade aos inibidores de ALS, do grupo sulfonilureia. Para imidazolinona e triazolopirimidina, 50% das populações foram suscetíveis. Para o 2,4-D, a suscetibilidade foi de 30% e outros herbicidas com resistência confirmada como inibidores do fotossistema II, inibidores da síntese de AGCML e inibidores da EPSPS a dispersão foi muito baixa, com apenas 1% da população resistente.

Nesse contexto, *R. raphanistrum* é uma das espécies que figura no cenário das plantas daninhas de difícil controle. Na Austrália já foram documentados casos de resistência a herbicidas inibidores da ALS (OWEN; MARTINEZ POWLES, 2015), inibidores de fotossistema II (HASHEM et al. 2001), auxinas sintéticas (WALSH et al. 2004), inibidores da phytoene desaturase (LU et al. 2020a), resistência a inibidores da HPPD (LU et al. 2020b), inibidores de AGCML (BECKIE; BUSI e ZHANG, 2020) e resistência múltipla de herbicidas também foram confirmados em populações de *R. raphanistrum* oriundas do cinturão de grãos da Austrália Ocidental (OWEN, MARTINEZ E POWLES; 2015).

Entre os principais benefícios dos inibidores da enzima ALS destacam-se a elevada eficácia no controle, amplo espectro e o fato de que esses herbicidas são utilizados em baixas doses (g ha^{-1}), em oposição a outros pesticidas, que são aplicados na ordem de kg ha^{-1} (TRANEL; WRIGHT, 2002).

A resistência a esses herbicidas é, geralmente, devido à redução na sensibilidade da enzima alvo, devido a uma ou mais mutações no gene ALS (YU; POWLES, 2014). O mecanismo de resistência frequentemente relatado em plantas resistentes aos herbicidas inibidores de ALS baseia-se em uma única substituição de aminoácidos na enzima ALS. Existem cinco regiões altamente conservadas no gene ALS. Em todos os casos investigados, a resistência aos herbicidas inibidores da ALS foi atribuída a uma alteração em um dos oito aminoácidos localizados nestas regiões incluindo Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574, Ser-653 e Gly-654 (YU; POWLES, 2014). As substituições desses aminoácidos no sítio de ação do gene ALS, que ocorrem naturalmente em populações de plantas daninhas, são selecionadas com a aplicação do herbicida. As mutações nestes oito aminoácidos interrompem a ligação do herbicida convertendo assim a enzima antes suscetível em enzima resistente ao herbicida (TAN; MEDD, 2002; CORBETT; TARDIF, 2006).

O padrão da resistência aos herbicidas ALS, devido a alteração no sítio de ação, varia de acordo com a posição e com o aminoácido que é substituído. Por exemplo a substituição

de Trp-574-Leu confere alto nível de resistência a todas as famílias de herbicidas inibidores de ALS em muitas espécies de plantas daninhas (POWLES; YU, 2010). Substituições de aminoácidos Ala-122, Ala-205 e Ser-653 conferem resistência às imidazolinonas e baixo nível de resistência às sulfoniluréia (POWLES; YU, 2010).

O mecanismo de resistência a herbicidas não dotados de mutações no sítio de ação, geralmente, envolvem detoxificação dos herbicidas pelas enzimas do citocromo P450 monooxigenase (P450) e glutathione S-transferase (GST), absorção reduzida, aumento ou redução da translocação na planta e sequestro do herbicida nos vacúolos (CATANEO et al., 2003; KAUNDUN et al., 2013; SHANER; LINDENMEYER; OSTLIE, 2011).

Esse estudo objetivo comprovar a resistência cruzada a inibidores da ALS em um biótipo de *R. raphanistrum* da região Oeste do Paraná, por meio de ensaio de dose resposta conduzido em duas gerações e avaliar o mecanismo de resistência.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Coleta das sementes e biótipos.

As sementes do biótipo de *R. raphanistrum* foram obtidas na região Oeste do Paraná, município de Catanduvas (25°21'26"S, 53°08'51"O e 752 m). As sementes foram obtidas a partir da coleta de dez siliquis em nove plantas que não foram controladas após a exposição ao herbicida metsulfuron-methyl (2,0 g ha⁻¹ de i.a.). O local da coleta trata-se de uma lavoura comercial com histórico de cultivo de soja na primeira safra e trigo na segunda safra, em sistema de sucessão de culturas. As siliquis foram enviadas ao laboratório para debulha, limpeza e identificação. Esse foi o biótipo com suspeita de resistência (R). O biótipo suscetível (S), foi coletado em Lages-SC, em área não-agrícola e sem histórico de aplicação de herbicidas, localizada no Centro de Ciências Agroveterinárias (27°47'36"S, 50°18'08"O e 914 m), onde apenas se realiza a roçada para controle de plantas daninhas. Para o biótipo S foram coletadas todas as siliquis maduras em dez plantas.

4.4.2 Ensaios de dose resposta na geração F1.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em Lages-SC. Cada unidade experimental foi composta por uma planta, em um vaso plástico de volume 0,4 dm³, preenchido com substrato comercial inerte. As sementes foram previamente tratadas com ácido giberélico, na concentração de 5%, antes da semeadura, para estimular a quebra da dormência. Foram semeadas 2 sementes por unidade experimental, após o período de estabelecimento foi realizado o desbaste, mantendo uma planta por unidade experimental.

Os tratamentos consistiram na combinação de dois biótipos (R e S), três herbicidas [metsulfuron-methyl (sulfonilureia), imazethapyr (imidazolinonas) e pyroxsulam (triazolopirimidina)] e sete doses diferentes de acordo com os biótipos. Nessa geração chamada F1, que correspondeu a geração coletada a campo.

No biótipo R aplicou-se as doses: 0, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 vezes a dose recomendada para cada herbicida. Já no biótipo S, as doses foram: 0, 0,125; 0,250; 0,5; 1, 2 e 4 vezes a dose recomendada. Essa variação na dose, foi utilizada devido à baixa disponibilidade de plantas e pela sensibilidade do biótipo S aos inibidores da ALS. O biótipo resistente foi submetido a doses superiores com intuito de alcançar controle superior a 50%.

As doses recomendadas para a cultura do trigo no controle de nabiça foram 3,96; 106 e 15,3 g ia ha⁻¹, respectivamente para os herbicidas metsulfuron-methyl, imazethapyr e pyroxsulam. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

As plantas foram mantidas com irrigação intermitente até o momento da aplicação dos tratamentos, quando estavam no estágio ideal de controle, com 2 a 4 folhas verdadeiras. Nesse momento as plantas foram retiradas da casa de vegetação e os tratamentos foram aplicados. A aplicação, foi realizada com pulverizador de precisão CO₂, com pontas XR 110 02, altura de 50 cm do alvo, com taxa de 200 L ha⁻¹, pressão de trabalho de 220 KPa, velocidade de 3,6 m s⁻¹, com barra de 4 pontas espaçada 50 cm entre bicos. As condições do tempo no momento da aplicação estão dispostas na Tabela 1. Ao término da aplicação as unidades experimentais foram levadas novamente para casa de vegetação e aguardado 24 horas para retorno da irrigação.

Tabela 1 – Condições climáticas no momento da aplicação dos herbicidas inibidores de ALS na geração F1 de *Raphanus raphanistrum*.

Data	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Velocidade do vento (m s ⁻¹)	Nebulosidade
29/01/2020	25	75	1,8	Nublado

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Aos 21 dias após a aplicação (DAA) foi realizada a avaliação do controle, com base na escala de controle de 0 a 100 %, onde 0 significa nenhum controle e 100% controle total (SBCPD, 1995).

4.4.3 Ensaios de dose resposta na geração F2.

Para condução da geração F2, as plantas foram mantidas para produção de sementes na geração F1 dos dois biótipos, com repetições individuais para cada herbicida separado. As plantas com suspeita de resistência (30 plantas), foram mantidas isoladas e realizada a fecundação manual. Após a fecundação manual as plantas foram mantidas em condição ambiente, tomando o cuidado de eliminar todas as plantas de nabiça presentes a uma distância de 100 m. A manutenção das plantas em condição ambiental possibilitou a obtenção de maior quantidade sementes.

Após a secagem as sílicas foram coletadas e levadas ao laboratório, onde se realizou a debulha manual, atividade que tem que ser realizada com muito cuidado, já que a sílica, é muito resistente e impactos na semente podem danificar e inviabilizar a mesma.

Na geração F2 o procedimento de aplicação e avaliação seguiu o mesmo da geração F1, com dados do momento da aplicação descritos na Tabela 2. Nessa geração foram adotadas doses diferentes da geração F1, buscando maior controle no biótipo com suspeita de resistência, foram repetidas também as doses no biótipo suscetível e resistente e utilizadas 4 repetições.

Tabela 2 – Condições climáticas no momento da aplicação dos herbicidas inibidores de ALS na geração F2 de *Raphanus raphanistrum*.

Data	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Velocidade do Vento (m s ⁻¹)	Nebulosidade
24/07/2020	20,8	65,2	2,0	Aberto

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

As doses utilizadas na geração F2 foram: 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 D para os dois biótipos, onde D é a dose padrão de bula do herbicida, a mesma da primeira geração.

As avaliações foram realizadas aos 28 DAA, foi realizada a avaliação final com base na escala de controle de 0 a 100%.

Com a confirmação da resistência cruzada a inibidores da ALS no biótipo oriundo de Catanduvas - PR, partiu-se para os estudos de investigação do mecanismo de resistência. Para isso foi verificado se existe alteração no sítio de ação devido a mutação na enzima alvo do herbicida e se a maior capacidade de detoxificação estaria envolvida na resistência.

4.4.4 Ensaio para identificação de mutação na enzima ALS

4.4.4.1 Extração de DNA

Para análises de DNA, os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias-CAV/UDESC, onde possui a estrutura necessária e os reagentes necessários para as análises moleculares. Para análise do DNA das plantas na região codificadora da enzima ALS foram coletados fragmentos foliares dos dois biótipos; sendo coletadas 10 amostras para cada biótipo. Essas amostras foram submetidas a extração de DNA utilizando 100 mg de tecido foliar macerado em nitrogênio líquido. A extração foi realizada com o Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), conforme recomendações do fabricante. Após a extração do DNA, foram feitas as quantificações de qualidade através do equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Todas as amostras extraídas apresentaram a qualidade necessária para a utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.4.4.2 PCR e Sequenciamento.

Com as amostras de DNA extraídas, as mesmas foram submetidas a PCR para amplificação do gene ALS. Foram utilizados oligonucleotídeos descritos por Tan e Medd (2002) e Han et al. (2012) (Tabela 6).

Tabela 3 – Primers utilizados para amplificação e sequenciamento do gene ALS em populações de *Raphanus raphanistrum* suscetíveis e resistente a inibidores de ALS

Primer ¹	Sequência 5'-3'
WR 376 F	TTGCGAGTACTTTGATGGGG
WR 376 R	GCTTCTGCTCGCTCAATTCAC
WR 122 F	TCTCCCGATACGCTCCCGACG
WR 205 R	GCAAGCTGCTGCTGAATATCC
WR 574 F	TTGTCATCATCAGGCCTTGGA
WR 653 R	TCAGTACTTAGTGCGACCATC

Fonte:¹Tan e Medd (2002); Han et al. (2012) e Yu et al. (2012)

Para a amplificação na PCR da região alvo utilizou-se oligonucleotídeos 34,75 µL de H₂O (água isenta de nuclease), 10 µL de Buffer 5X, 1 µL de Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), 1 µL de oligonucleotídeo homólogo (F) (3,2 µM), 1 µL de oligonucleotídeo reverso (R) (3,2 µM), 0,25 µL de Taq DNA Polymerases e 2 µL de DNA (~10ng ul⁻¹) de cada biótipo, totalizando volume final de 50 µL. O programa no termociclador consistiu em: 94°C por 4 minutos; 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e a 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos e finalizou com 4°C. Após a amplificação foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%; os fragmentos amplificados foram corados com GelRed, visualizados e fotografados sob luz ultra-violeta.

Amostras que apresentaram amplificação com tamanho esperado foram enviadas para sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos indicados anteriormente (ACTGENE Análises moleculares LTDA).

As sequências obtidas com os oligonucleotídeos homólogo e reverso foram utilizadas para gerar a sequência consenso (programa DNA Baser), a qual foi utilizada para comparação com a sequência de nucleotídeos e aminoácidos *R. raphanistrum* depositados no *GenBank*, sendo as fitas comparadas a dois acessos, AJ344985 e AJ344987.

4.4.5 Ensaio com inibidor de metabolização

Para verificação da metabolização de herbicidas pelo citocromo P450 utilizou-se o malathion, molécula inseticida que bloqueia as enzimas do complexo P450.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC (CAV-UDESC) em Lages, o experimento consistiu em 40 unidades experimentais divididas em 10 tratamentos, cada unidade experimental consistiu em uma planta em um vaso plástico com capacidade volumétrica de 0,4 dm³.

O delineamento experimental utilizado foi o experimento fatorial (DIC) e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial, onde o fator A compreendeu os herbicidas do grupo químico inibidores da ALS e o fator B avaliou os inibidores do citocromo P450 monooxigenase (malathion). Os tratamentos constituíram-se pela aplicação de malathion mais aplicação dos herbicidas isolados, apenas os herbicidas e testemunha sem aplicação. Duas horas antes da aplicação dos herbicidas metsulfuron-methyl, imazethapyr, imazamox e penoxsulam, na dose de 3,96; 106; 91 e 15,3 g i.a. ha⁻¹, respectivamente, aplicou-se o inibidor de metabolização malathion na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.

Quando a maioria das plantas atingiram o estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas verdadeiras, as unidades experimentais foram retiradas da casa de vegetação para aplicação dos herbicidas. A aplicação foi realizada com pulverizador costal de precisão pressurizado a CO₂, com quatro pontas jato plano AD 110 02 na altura de 50 cm acima do alvo com volume de aplicação de 200 L ha⁻¹, espaçamento entre bicos 50 cm, velocidade de 3,6 km h⁻¹ e pressão de trabalho 220 kPa. Após a aplicação do herbicida, os vasos foram levados para a casa de vegetação, permanecendo sem irrigação por 24 horas a fim de não interferir na absorção dos herbicidas.

Avaliou-se o controle aos 28 dias após aplicação (DAA). Utilizou-se como base a escala percentual, em que a nota 0% correspondeu a nenhum efeito do herbicida e a nota 100% significou morte das plantas. A matéria seca da parte aérea (MSPA) também foi avaliada, cortando-se rente ao solo todas as plantas do vaso aos 28 DAA e, posteriormente, secas em estufa a 65 °C por 72 horas até peso constante, quando foi realizada a quantificação da MSPA em balança de precisão (0,001 g).

4.4.6 Análise estatística

Primeiramente os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e quando apresentaram significância foram analisados por regressão não linear.

Para confirmação da resistência deve se ter informações dos dados de dose letal 50 (DL₅₀), que é a dose necessária para controlar 50% da população, a partir da DL₅₀ é calculado o fator de resistência (FR), o qual indica a quantidade necessária a ser aplicada no biótipo resistente para que se obtenha o mesmo controle do biótipo suscetível, o mais usual é o FR₅₀, que é calculado para obtenção de 50 % de controle.

Para o controle o modelo utilizado para as análises de regressão foi exponencial de dois parâmetros (STREIBIG, 1988).

$$y = a(1 - e^{-bx})$$

Equação 1: y: porcentagem de controle; x: dose do herbicida; a e b: coeficientes da curva, sendo a ponto máximo da curva; b: mostra a inclinação da curva.

De posse dos valores da DL₅₀, obteve-se o Fator de Resistência (F), que correspondeu à razão entre a DL₅₀ do biótipo resistente em relação a DL₅₀ do biótipo suscetível. Na geração F1, foi impossibilitada a adoção do DL₅₀, devido ao controle máximo obtido com o herbicida pyroxulam, não atingir os 50%, dessa maneira utilizou-se o DL₂₅, sendo a dose necessária para controlar 25% da população. O fator F (FR=DL_{50R}/DL_{50S}) expressa o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% do biótipo resistente é superior à dose que controla 50% do biótipo suscetível (HALL; STROME; HORSMAN. 1998). Esse parâmetro é um indicativo do nível de resistência.

Como critérios para confirmação da resistência, este trabalho seguiu as informações da HRAC e SBCP (2018), foi considerado resistente quando três informações forem atendidas, 1) o fator de resistência maior que 1, 2) a dose recomendada do herbicida não proporcionar controle superior a 80% e 3) a resistência for uma característica herdável, se mantendo na geração F2.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Dose Resposta

A análise de variância foi significativa para a variável controle com interação significativa dos fatores herbicidas e doses, para ambos os biótipos nas duas gerações. Desta forma, procedeu-se a análise de regressão não-linear para determinação dos parâmetros de DL_{25} ou DL_{50} e FR.

4.5.1.1 Metsulfuron-methyl

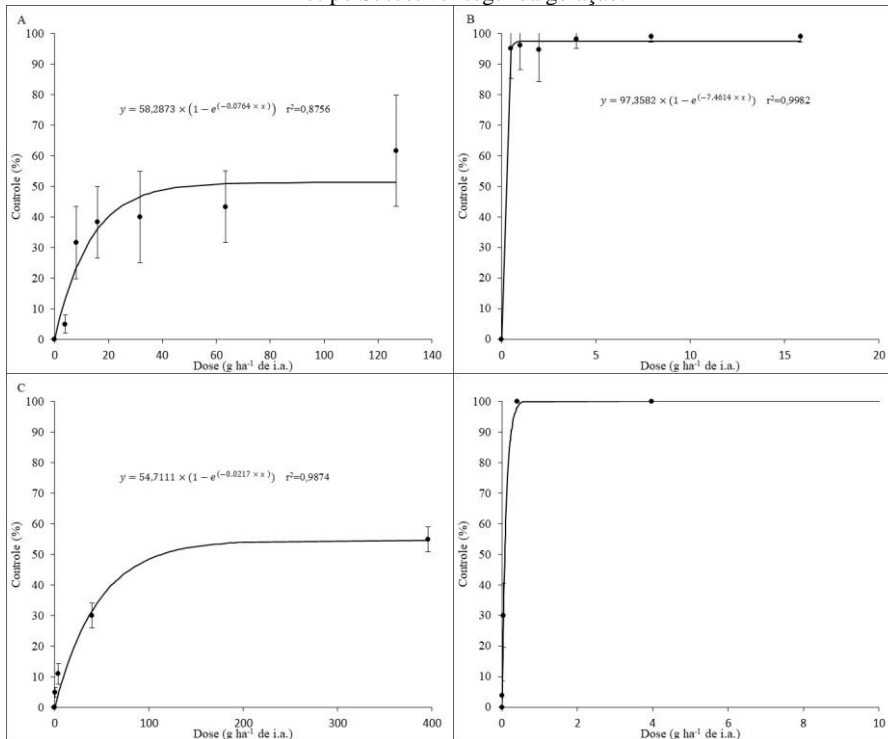
O controle do herbicida metsulfuron-methyl variou de acordo com o biótipo avaliado (Figura 2). Para o biótipo R na geração F1, obteve-se controle máximo de 50% com a dose 126,7 g i.a. ha^{-1} (Figura 1A), na geração F2 o controle foi de aproximadamente 55 % com dose muito superior, de 396 g i.a. ha^{-1} (Figura 2C). Os resultados encontrados foram semelhantes a reportados por Costa et al (2020), que trabalharam com biótipos de *R. sativus* e *R. raphanistrum*, oriundos de Cafelândia - PR, Júlio de Castilhos - RS e Cruz Alta - RS.

Mesmo em doses baixas o controle foi muito próximo a 100% na geração F1 do biótipo S (Figura 2B). Na geração F2, o controle na dose 0,0396 g i.a. ha^{-1} foi de aproximadamente 30% e a dose a partir de 0,1 g i.a. ha^{-1} atingiu de controle de 100% (Figura 2D).

Os resultados deste trabalho de dose resposta são próximos aos obtidos por Costa e Rizzardi (2014), que verificaram a resistência de *R. raphanistrum* a metsulfuron-methyl, aos 35 DAA obtiveram que, o biótipo S, na dose mais baixa de 0,6 g i.a. ha^{-1} obteve 80% de controle, e na dose comercial controle de 99%, mantendo o controle de 100% a partir dessa dose. O biótipo R provou-se insensível ao herbicida até a dose de 4,8 g i.a. ha^{-1} , com 6% de controle na dose de 9,6 g i.a. ha^{-1} e 80% na dose mais alta, muito próximo ao obtido neste trabalho.

A partir dos dados das curvas de dose resposta calculou-se os parâmetros DL, FR e controle máximo (Tabela 3). Percebe-se a diferença das doses letais para os biótipos, na primeira geração não foi possível calcular a DL e FR com base no controle de 50% devido ao herbicida pyroxsulam não atingir controle superior a 30% no biótipo resistente. Pelos resultados pode-se perceber um elevado fator de resistência, que chegou a 1516 na geração F2, demonstrando o alto nível de resistência ao metsulfuron-methyl.

Figura 2 – Curvas de dose resposta para Metsulfuron-Methyl, A: Biótipo Resistente primeira geração, B: Biótipo Suscetível primeira geração, C: Biótipo Resistente segunda geração e D: Biótipo Suscetível segunda geração.



Costa e Rizzardi (2014), obtiveram fator de resistência de 267, valor menor que o obtido neste trabalho. Os mesmos autores relataram doses letais (DL50) de 98 e 0,36 para o biótipo R e S, respectivamente, sendo a dose letal do biótipo resistente, próxima a obtida neste trabalho; já a dose letal do biótipo sensível, muito mais elevada, esse fator pode ser devido às diferenças de suscetibilidade existentes entre as populações (variação intraespecífica).

Cechin et al. (2016) desenvolveram pesquisa com resistência de *R. sativus* a iodosulfuron (sulfoniluréia) e obtiveram fatores de resistência de 89 e 252 para duas populações oriundas do Rio Grande do Sul. Esses valores ficam bem abaixo dos encontrados neste trabalho.

Tabela 4 – Fator de resistência, dose letal (g i.a.ha⁻¹) e controle máximo (%) obtidas nas duas gerações F1 e F2 para metsulfuron-methyl.

F1					
Biótipo	DL 25	FR 25	DL 50	FR 50	Controle máximo
R	8,75	219,84	49,02	505	50,0
S	0,35		0,097		100,0
F2					
R	-	-	113	1516	77,5
S	-		0,075		100,0

Fonte: Elaboração do autor, 2021.

Dentre os fatores que alimentam o surgimento de casos de resistência, destaca-se a alta eficiência dos herbicidas, ou seja, quando o produto se torna um agente de elevada pressão de seleção. Esta propriedade é maior ainda quando se apresenta elevada eficiência em baixas doses. Outro fator relacionado ao herbicida que contribui para a seleção de biótipos resistentes é a atividade residual longa no solo (MARIANI et al 2015). Esses fatores são observados em herbicidas inibidores da ALS.

O número de trabalhos que demonstraram fatores de resistência tão altos como este é muito baixo, a partir de 10 é considerado altamente resistente. Assim, este biótipo apresenta uma profunda insensibilidade ao herbicida metsulfuron-methyl. Pavan (2018), também obteve fatores de resistência maiores que 10, para resistência ao glyphosate, trabalhando com diferentes biótipos de capim-amargoso oriundos de diversos estados do Brasil. Sabe-se que os inibidores da ALS são os herbicidas que tendem a apresentar maiores porcentagens iniciais de indivíduos resistentes na população, sendo que em uma população a frequência é de 10⁻⁶ (YAMASHTA; GUIMARÃES, 2013). A elevada eficiência no controle das plantas daninhas, intensifica o processo de seleção.

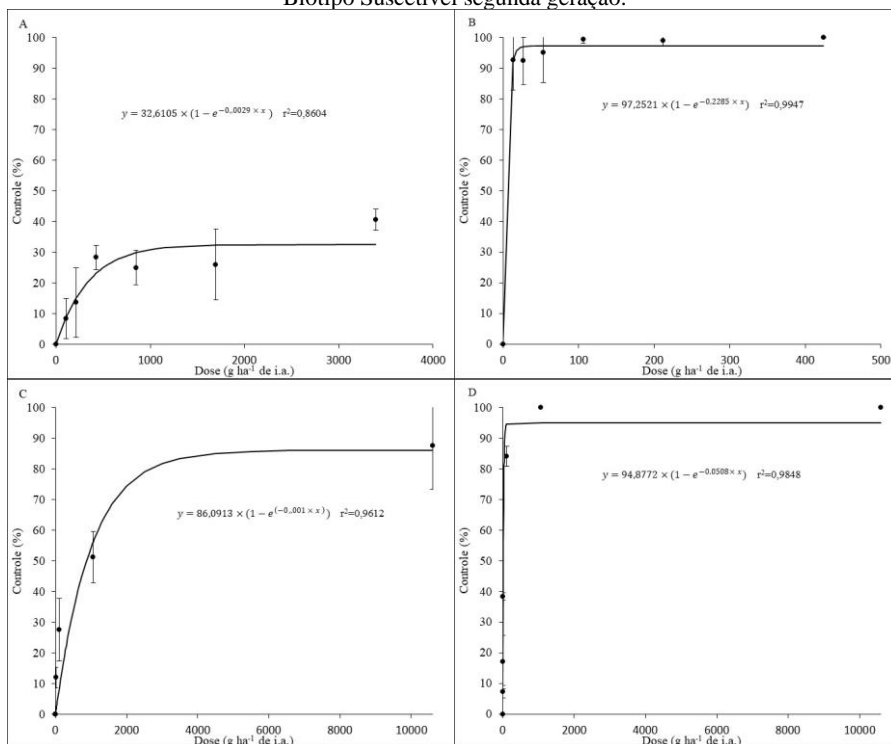
4.5.1.2 Imazethapyr

As curvas de dose resposta do herbicida imazethapyr (Figura 3) seguiram a mesma tendência dos resultados obtidos no herbicida metsulfuron-methyl, sendo que na geração F1, para o biótipo R o controle máximo obtido ficou em torno de 40%, mesmo na maior dose aplicada. Na geração F2, o controle foi superior e chegou a próximo a 90%, com dose de 10.600 g i.a. ha⁻¹. Nesse ensaio o controle foi superior ao obtido para metsulfuron-methyl. Em trabalhos com dose resposta de imazethapyr em picão-preto, Takano et al. (2016), não alcançaram controle maior que 20% no biótipo com suspeita de resistência, utilizando dose de 1.000 g i.a. ha⁻¹, impossibilitando a adoção do fator de resistência neste biótipo. Utilizando a dose padrão

de bula 106 g i.a ha⁻¹, Costa et al. (2021) não encontraram nenhum controle em biótipo de nabiça oriundo de Cafelândia-PR, já nos biótipos suscetíveis o controle foi efetivo.

No biótipo S na geração F1 mesmo na menor dose com 13 g i.a. ha⁻¹, já se obteve controle muito próximo a 100%. Na geração F2, a partir de 50 g i.a. ha⁻¹ atingiu-se controle próximo a 100%.

Figura 3 – Curvas de dose resposta para Imazethapyr, A: Biótipo Resistente primeira geração, B: Biótipo Suscetível primeira geração, C: Biótipo Resistente segunda geração e D: Biótipo Suscetível segunda geração.



Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

Quanto aos parâmetros DL, FR e controle máximo (Tabela 4), a DL 25, controle máximo e FR 25, foram de, 506 g.i.a ha⁻¹, 1,30 g.i.a ha⁻¹, 41%, 100% e 387,7 respectivamente para os biótipos R e S na geração F1. Na geração F2, os valores foram de 870 g.i.a ha⁻¹, 14,75 g.i.a ha⁻¹, 88%, 100% e 58,98 respectivamente. Observa-se que imazethapyr apresentou fatores de resistência menores que os obtidos no herbicida metsulfuron-methyl. Em trabalho com *Bidens subalternans* resistente a imazethapyr, Mendes et al. (2019) obtiveram fatores de

resistência de 59,4 e 58,7, relativamente, valores similares aos obtidos na geração F2 deste trabalho.

Tabela 5 – Fator de resistência, dose letal (g i.a.ha⁻¹) e controle máximo (%) obtidas nas duas gerações F1 e F2 para imazethapyr.

F1					
Biótipo	DL 25	FR 25	DL 50	FR 50	Controle máximo
R	506	387,7	>3392	-	41
S	1,30		3,16		100
F2					
R	-	-	870,0	58,98	88,0
S	-		14,75		100,0

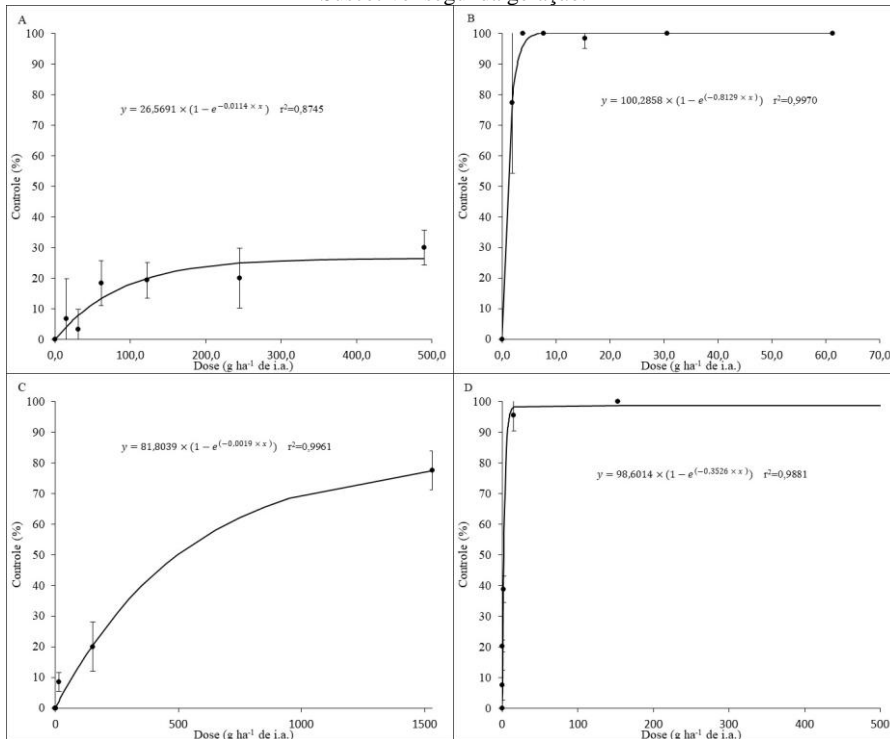
Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

4.5.1.3 Pyroxsulam

O herbicida pyroxsulam também apresentou o mesmo comportamento dos demais, sendo mantida a diferença entre os dois biótipos de nabiça pelas curvas de dose resposta (Figura 4). No biótipo R, o herbicida foi o que proporcionou menor controle da geração F1, onde se obteve controle máximo de 30%, impossibilitando assim a adoção do fator de resistência com base em 50; na geração F2 o controle foi superior, ficando na maior dose em aproximadamente 80%. Os resultados da literatura envolvendo resistência a pyroxsulam são escassos, isso se deve ao herbicida ter sido registrado recentemente para a cultura do trigo. Os resultados também concordam com Costa et al. (2021), onde obteve resistência de um biótipo de nabiça a esse herbicida, embora não tenha feito estudos de dose resposta, utilizou-se apenas dose de bula.

O biótipo S apresentou, na geração F1 um controle de 90 a 100% a partir da menor dose utilizada, 1,9 g i.a. ha⁻¹. Na geração F2, a partir de 5,5 g i.a. ha⁻¹, obteve-se níveis de controle acima de 80%. Os inibidores de ALS, são muito efetivos em baixas doses, os três grupos químicos utilizados neste trabalho, sulfonilureia, imidazolinona e triazolpirimidina, apresentaram o mesmo comportamento no biótipo suscetível, com elevada eficiência, este fator pode ter sido determinante na evolução da resistência a esse grupo de herbicida.

Figura 4 – Curvas de dose resposta para Pyroxsulam, A: Biótipo Resistente primeira geração, B: Biótipo Suscetível primeira geração, C: Biótipo Resistente segunda geração e D: Biótipo Suscetível segunda geração.



Fonte: elaborado pelo autor, 2021

Os resultados de DL, FR e controle máximo novamente ilustram o elevado nível de resistência (Tabela 5). Com o amplo comprometimento do grupo dos inibidores da ALS, o controle de plantas daninhas de folhas largas na cultura do trigo fica dificultado, além disso, as alternativas consistem em herbicidas com elevada capacidade de causar fitointoxicação, ou que exigem um conhecimento mais aprofundado para a sua aplicação.

Devido aos elevados fatores de resistência obtidos nesse trabalho especulou-se que a ocorrência de mutação da enzima alvo seria o mecanismo de resistência mais cabível, onde mesmo com grande quantidade de herbicida, a ligação com a enzima alvo não é realizada. Assim não ocorre a inibição da síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina e o biótipo resistente mantém o crescimento após a aplicação do herbicida.

Tabela 6 – Fator de resistência, dose letal (g i.a.ha⁻¹) e controle máximo (%) obtidas nas duas gerações F1 e F2 de Penoxsulam.

F1					
Biótipo	DL 25	FR 25	DL 50	FR 50	Controle máximo
R	250	706	>489,6		30,0
S	0,35		0,87		100,0
F2					
R			498	247,7	77,5
S			2,01		100,0

Fonte: elaboração do autor, 2021.

Através dos resultados das taxas de resistência obtidos pelo ajuste das curvas de dose resposta, é correto afirmar que o biótipo R possui alto grau de resistência aos três herbicidas testados, FR>1, controle muito inferior a 80% com a aplicação da dose recomendada e a resistência foi herdável, sendo mantida na geração F2, comprovando assim a resistência cruzada aos inibidores de ALS. Já o biótipo S, mostrou-se suscetível aos herbicidas avaliados neste estudo.

Esta existência ilustrada aqui neste trabalho, é devido, a hipótese de ocorrência de uma mutação na enzima alvo ALS, outros estudos já chegaram a estes mesmos resultados, dentre eles, Han et al. (2012), investigaram o efeito da mutação Ala-122-Tyr e chegaram ao resultado de resistência cruzada aos inibidores de ALS. Os fatores de resistência, foram muito elevados, assim como obtidos nesse trabalho, para SU, foram maiores de 1024, para TP, maiores de 512 e IMI maiores que 137. Estes valores foram estimados pelo autor, devido a não atingir a dose para o controle de 50%, com 640, 384 e 1600 g ha⁻¹, de chlorsulfuron, metosulam e imazamox, respectivamente. Os mesmos autores fizeram testes *in vitro* com herbicidas, os valores de fator de resistência chegaram a quase 100.000 vezes.

Com a confirmação da resistência cruzada, atenta-se mais uma vez para mais uma planta daninha de difícil controle, que é predominante nos cultivos de inverno e, vem ganhando espaço em áreas de verão nas lavouras do Sul do Brasil. Já se tem o conhecimento sobre a sua elevada diversidade genética, que resultou em seleção de biótipos com resistência múltipla a herbicidas na Austrália. Dessa maneira, deve-se elaborar de forma criteriosa e com conhecimento científico, as estratégias para manejo e prevenção do surgimento de resistência múltipla em biótipos de nabiça no Brasil. Essa evolução da resistência elevaria ainda mais a complexidade do manejo dessa planta daninha.

4.5.2 Mecanismo de resistência

4.5.2.1 Ensaio para identificação de mutação na enzima ALS

A amplificação do DNA genômico com os oligonucleotídeos listados na Tabela 6, produziram-se três fragmentos de DNA, abrangendo as regiões, A, B, C, D e E, onde acontecem a maioria das modificações de aminoácidos que são importantes para a base da resistência no gene ALS (TAN; MEDD, 2002; TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2021).

O sequenciamento parcial do gene ALS demonstrou que, no biótipo resistente, a base guanina (G) foi substituída por uma timina (T). Essa mudança de base configura a substituição do aminoácido triptofano na posição 574 pela leucina (Trp-574-Leu) no gene ALS (Tabela 8). Não foi encontrada nenhuma mutação nas demais regiões que conferem resistência a inibidores da ALS (Tabela 8). A mutação Trp-574-Leu no domínio B do gene ALS é conhecida por causar resistência a todos os grupos químicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS, ou seja, as sulfoniluréia (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidina (TP), pirimidinilbenzoatos (PB) e sulfonilaminocarbonil-triazolinonas (SCT). Essa mutação já foi identificada em várias espécies de plantas daninhas resistentes (POWLES; YU, 2010; YU; POWLES, 2014), incluindo *R. raphanistrum* (TAN; MEDD, 2002; YU et al., 2003; HAN et al., 2012; YU et al., 2012).

Tabela 7 – Sequências nucleotídicas e aminoácidos correspondentes encontradas nos biótipos de nabiça.

População	Sequência nucleotídica 5'-3'							
	122	197	205	339	360	376	574	653
Suscetível	GCT	CCT	GCG	TAT	GCT	GAT	TGG	AGT
	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Asp	Trp	Ser
Resistente	GCT	CCT	GCG	TTC	TCT	GAT	TTG	AGT
	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	Asp	Leu	Ser

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Fragmentos do gene ALS sequenciados nesse trabalho, também demonstraram algumas mutações não conhecidas na literatura por causar resistência à herbicidas inibidores da ALS. A mutação Ala-360-Ser e Tyr-339-Phe podem estar relacionadas a novos mecanismos de mutação, mas sabe-se também que muitas mutações ocorrem normalmente no gene ALS, sem causar qualquer problema à planta ou estar associada a resistência a herbicidas. A mutação Ala-360-Ser, já foi descrita apenas em biótipo de nabiça com origem em Cafelândia-PR, em trabalho desenvolvido por Costa et al. (2021), a mutação Tyr-339-Phe, não foi descrita em nenhuma literatura até o momento, podendo se configurar uma nova mutação.

Segundo Mendes et al. 2020, a mutação nesta posição Trp-574-Leu, causa um aumento no volume do canal devido a cadeia lateral de leucina ocupar um espaço muito menor que triptofano, esse canal é onde o herbicida tende a se ligar com a enzima ALS, o bloqueio da abertura da cavidade, resultante da mutação muda as posições potenciais de ligação, resultando em redução da atividade herbicida.

São raros os trabalhos que mostram dupla mutação a inibidores de ALS; com *Glebionis coronaria* da Tunísia, Zeineb et al. (2021) mostraram que uma planta da população apresentou mutação Pro-197-Arg e Asp-376-Glu, entretanto, quando identificou mutação na posição 574, nenhuma outra mutação foi encontrada.

A substituição Trp-574-Arg foi relatada pela primeira vez em *Digitaria sanguinalis* na China. Substituições no local Trp-574 foram documentados para conferir ampla resistência cruzada à inibidores de ALS. A resposta à dose revelou resistência aos grupos químicos SU, IMI e TP (MURPHY; TRANEL, 2019)

A resistência envolvendo essa mesma mutação já foi reportada por Costa et al. (2021) e Cechin et al. (2017), que trabalharam com biótipos de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, nesses estudos também foi confirmada a resistência cruzada.

4.5.2.2 Ensaio com inibidor de metabolização

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que o biótipo resistente não apresenta nenhum mecanismo envolvido com a metabolização de herbicidas, devido a não ser observada diferença significativa nas avaliações realizadas de controle e matéria seca da parte aérea (Tabela 9). Assim o crescimento e o desenvolvimento do biótipo não foram prejudicados com a paralização do sistema de detoxificação de herbicidas envolvido com o complexo P450, outros mecanismos, embora não investigados, não são responsáveis por mutação a inibidores de ALS.

Os mecanismos de resistência não relacionados a alteração na enzima alvo são pouco frequentes quando se trata de resistência envolvendo os herbicidas inibidores da ALS, sendo que até o momento, poucos biótipos apresentam este mecanismo de resistência. Para classe das Magnoliopsidas raramente se registra casos de metabolização como mecanismo de resistência (VELDHUIS et al. 2011). Porém pesquisas recentes mostram que a metabolização é um mecanismo importantes para inibidores de ALS em biótipos de *Papaver rhoeas*, que possuem genótipos idênticos de ALS em plantas suscetíveis e resistentes; porém, exibem diferentes fenótipos relacionados a resistência a herbicidas, essas diferenças foram atribuídos a

mecanismos NTSR (DÉLYE; PERNIN; SCARABEL, 2011). Isso sugere que a importância do NTSR para os inibidores de ALS pode muito bem ser subestimado em plantas daninhas da classe Magnoliopsidas, possivelmente devido à alta frequência de TSR (DÉLYE, 2012).

Tabela 8 – Controle (%) e matéria seca (g), em diferentes tratamentos com e sem a utilização de bloqueador de P450 (malathion) em biótipo resistente de nabiça a inibidores de ALS.

Tratamento	Dose (g.ia. ha ⁻¹)	Controle (%)	Matéria Seca (g)
Testemunha	0	0 ^{n.s}	0,82 ^{n.s}
Malathion	2000	0	0,91
Metsulfuron Methyl	3,96	0	1,06
Imazethapyr	106	0	1,44
Pyroxsulam	15,3	0	1,48
Imazamox	91	0	1,21
Metsulfuron Methyl + Malathion	3,96 + 2000	0	0,75
Imazethapyr + Malathion	106 + 2000	0	1,15
Pyroxsulam + Malathion	15,3 + 2000	0	0,92
Imazamox + Malathion	91 + 2000	0	1,13
CV (%)	-	-	84,71

^{n.s.}: não significativo pelo teste F (p>0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor. 2021

Christopher et al. (1991) investigaram o mecanismo de *Lolium rigidum* a inibidores de ALS por aumento de metabolização. Esses autores obtiveram como resultado que a detoxificação do herbicida era idêntica a encontrada no trigo, onde a partir da atividade do citocromo P450 e enzimas glutationa-s-transferase, a planta metaboliza os herbicidas inibidores da ALS. Em outro estudo, Christopher; Preston e Powles (1994), compararam biótipos de *Lolium rigidum* e doses de malathion com aplicação de inibidores de ALS e a avaliação de controle mostrou que, quando se elevou as doses de malathion, o controle foi elevado, ou seja, o mecanismo de resistência envolvia a participação das enzimas do complexo P450.

Os resultados obtidos neste estudo concordam com os obtidos por Costa (2017), que não encontrou presença de metabolização em biótipos de nabiça com a utilização de malathion. Não há grande número de casos de resistência envolvendo mecanismos que não seja por mutação do sítio de ação para herbicidas ALS. Mas dentre esses mecanismos, a resistência metabólica através do complexo P450 monooxigenase, é a mais comum (YU; POWLES, 2014). O acúmulo de dois mecanismos de resistência (sítio de ação alterado e metabolização pelo complexo P450) tem sido relatado em *Lolium rigidum* e *Alopecurus myosuroides* (POWLES; YU, 2010)

R. raphanistrum foi diagnosticado com mecanismo não relacionados ao local de ação, mas para inibidores da PDS. O mecanismo envolve o citocromo P450, onde em trabalho realizado por Lu et al. (2020), realizaram a mesma metodologia deste trabalho, quando se inibiu o citocromo P450, ocorreu o controle da planta, sendo assim essa via a responsável pela resistência aos inibidores de PDS. O biótipo apresentou fatores de resistência de 4,9 para difludenican e 11,2 para fluridone.

4.6 CONCLUSÃO

O biótipo de nabiça oriundo do Oeste do Paraná apresentou resistência cruzada aos inibidores da enzima ALS, grupos químicos, sulfonilureia, triazolopirimidina e imidazolinonas, com elevado fator de resistência, baixo controle com a aplicação de dose recomendada e com herdabilidade da resistência.

A resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS do biótipo de nabiça de Catanduvas deve-se a uma mutação na posição 574 no domínio B da enzima ALS. Houve a substituição do triptofano (TGG) por uma leucina (TTG).

A mutação na posição 360, com a substituição de uma alanina (GCT) por serina (TCT) não é reportada na resistência a inibidores da ALS.

O aumento na capacidade de metabolização de herbicidas por enzimas do complexo P450, não é um mecanismo associado a resistência de nabiça a inibidores de ALS.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D. et al. Interference Periods of *Raphanus raphanistrum* L. in Sunflower Crop. **Planta Daninha**, v. 38, p. 1-8, 2020.
- ASHWORTH, M. B. et al. Identification of the first glyphosate-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) populations. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1432-1436, 2014.
- BECKIE, H. J.; TARDIF, F. J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v. 35, n. 3, p. 15-28, 2012.
- BECKIE, H.; BUSI, R.; ZHANG, B. Multiple resistant wild radish. **Weed Science**, v. 1, n. 1, p. 1-1. 2020.
- CATANEO, A.C. et al. Atividade de glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.
- CECHIN, J. et al. Mutation of Trp-574-Leu ALS gene confers resistance of radish biotypes to iodosulfuron and imazethapyr herbicides. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 299, 2017.
- CECHIN, J. et al. Resistance of radish biotypes to iodosulfuron and alternative control. **Planta daninha**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 151-160, 2016.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.
- CHRISTOPHER, J. T. et al. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). **Plant Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1036-1043, 1991.
- CHRISTOPHER, J.T.; PRESTON, C.; POWLES, S.B. Malathion antagonizes metabolism-based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 49, n. 3, p. 172-182, 1994.
- CORBETT, C. A. L.; TARDIF, F. J. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. **Pest Management Science**, v. 62, n. 7, p. 584-597, 2006.
- COSTA, L.O.; RIZZARDI, M.A. Resistance of *Raphanus raphanistrum* to the herbicide metsulfuron-methyl. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 181-187, 2014.
- COSTA, L. O. et al. Target-site resistance and cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in radish and wild radish biotypes from Brazil. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 1, p. 236-249, 2021.
- COSTA, L.O. **Resistência de *Raphanus raphanistrum* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS)**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2012.

DÉLYE, C.; PERNIN, F.; SCARABEL, L. Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 333-342, 2011.

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

HAN, H. 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**, v. 68, n. 8, p. 1164-1170, 2012.

HASHEM, A. et al. Triazine resistance in a biotype of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) in Australia. **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 636-641, 2001.

HASHEM, A. et al. Resistance of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in the Western Australia wheat belt. **Weed Technology**, v. 15, n. 1, p. 68-74, 2001.

HEAP, I. **The international herbicide-resistant weed database**. 2021. Disponível em: <http://www.weedscience.org/Home.aspx#:~:text=Weeds%20have%20evolved%20resistance%20to,cases%20of%20herbicide%20resistant%20weeds>. Acesso em: 18 mar. 2021.

HEAP, I. M. Identification and documentation of herbicide resistance. **Phytoprotection**, v. 75, n.4, p. 85-90, 1994.

HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1306-1315, 2014.

KAUNDUN, S. S. et al. A novel W1999S mutation and non-target site resistance impact on acetyl-coa carboxylase inhibiting herbicides to varying degrees in a UK *Lolium multiflorum* population. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1-11, 2013.

LU, H. *et al.* Non-target-site resistance to PDS-inhibiting herbicides in a wild radish (*Raphanus raphanistrum*) population. **Pest Management Science**, v. 76, n. 6, p. 2015-2020, 2020.

LU, H. *et al.* Non-target-site resistance to PDS-inhibiting herbicides in a wild radish (*Raphanus raphanistrum*) population. **Pest Management Science**, v. 76, n. 6, p. 2015-2020, 2020a.

- LU, H. *et al.* Evolution of resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a wild radish population via enhanced herbicide metabolism. **Pest Management Science**, v. 76, n. 5, p. 1929-1937, 2020b.
- MARIANI, F. et al. Herança da resistência de *Lolium multiflorum* ao iodosulfuron-methyl sodium. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p. 351-356, 2015.
- MENDES, R. R. et al. Multiple resistance to glyphosate and imazethapyr in *Bidens subalternans*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. 1-8, 2019.
- MENDES, R. R. *et al.* A Trp574Leu Target-Site Mutation Confers Imazamox Resistance in Multiple Herbicide-Resistant Wild Poinsettia Populations from Brazil. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1057, 2020.
- MURPHY, B. P.; TRANEL, P. J. Target-site mutations conferring herbicide resistance. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 382, 2019.
- OWEN, M. J.; MARTINEZ, N. J.; POWLES, S. B. Multiple herbicide-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations dominate Western Australian cropping fields. **Crop and Pasture Science**, v. 66, n. 10, p. 1079-1085 2015.
- PANDOLFO, C.E. et al. Limited occurrence of resistant radish (*Raphanus sativus*) to AHAS-inhibiting herbicides in Argentina. **Planta daninha**, v. 31, n. 3, p. 657-666, 2013.
- PAVAN, G. B. **Manejo de capim-amargoso perenizado e tolerante a glyphosate com herbicidas associados ou não a 2,4-D sal de dimetilamina e 2,4-D choline**. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Esalq/Usp, Piracicaba, 2018.
- POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.
- SHANER, D. L.; LINDENMEYER, R. B.; OSTLIE, M. H. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 3-9, 2011.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS (SBCPD). **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina: 1995. 42 p.
- STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v.28, p. 479-484, 1988.
- SBCPD. **10 Passos para relatos de novos casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Londrina-PR: HRAC, 2018. 2 p.
- TAKANO, H K. et al. Multiple resistance to atrazine and imazethapyr in hairy beggarticks (*Bidens pilosa*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 5, p. 547-554, 2016.
- TAN, M. K.; MEDD, R. W. Characterization of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 195-205, 2002.

- TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R.; HEAP, I. M. **Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em mar. 2021.
- TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, n.6, p.700-712, 2002.
- VARGAS, L. et al. Resposta de biótipos de *Euphorbia heterophylla* a doses de glyphosate. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1121-1128, 2011.
- VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, v.17, n.3, p.367- 373, 1999.
- VELDHUIS, L. J. et al. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapisarvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2986-2990, 2011.
- WALSH, M. J. et al. Multiple-herbicide resistance across four modes of action in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Science**, v. 52, n. 1, p. 8-13, 2004.
- WALSH, M. J. et al. Multiple-herbicide resistance across four modes of action in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Science**, v. 52, n. 1, p. 8-13, 2004.
- WALSH, M. J.; POWLES, S. B. Management of herbicide resistance in wheat cropping systems: learning from the Australian experience. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1324-1328, 2014.
- WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000
- YAMASHITA, O M; GUIMARÃES, S. C. Resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Varia Scientia Agrárias**, v. 3, n. 1, p. 189-215, 2013.
- YAMAUTI, M.S.; ALVES, P.L.C.A.; CARVALHO, L.B. Interações competitivas de triticale (*Triticum turgidosecale*) e nabiça (*Raphanus raphanistrum*) em função da população e proporção de plantas. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1, p. 129-135, 2011.
- YU, Q. et al. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed Research**, v. 52, n. 2, p. 178-186, 2012.
- YU, Q. et al. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science**, v. 51, n. 6, p. 831-838, 2003.
- YU, Q.; POWLES, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1340-1350, 2014.
- ZEINEB, H. et al. Point mutations as main resistance mechanism together with P450-based metabolism confer broad resistance to different ALS-inhibiting herbicides in *Glebionis coronaria* from Tunisia. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

5 ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE BIÓTIPOS DE *Raphanus raphanistrum* SUSCETIVEL E RESISTENTE A HERBICIDAS

5.1 RESUMO

A resistência de uma planta daninha a herbicida pode vir acompanhada de alguma desvantagem ecológica, isso pode dificultar o estabelecimento do biótipo resistente quando o herbicida não for utilizado. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a fenologia de dois biótipos de *Raphanus raphanistrum*. A pesquisa foi conduzida no período de agosto a dezembro de 2020, com a condução de dois experimentos concomitantes, com o biótipo suscetível e resistente em cultivo isolado ou em competição com a cultura do trigo. Os parâmetros avaliados foram: altura de plantas, número de folhas, área foliar, massa seca da parte aérea, taxa de crescimento, razão de área foliar, taxa assimilatória líquida e fenologia determinada pela escala BBCH. Os resultados indicaram um maior desenvolvimento e crescimento do biótipo sensível em relação ao biótipo resistente, além de uma precocidade desse biótipo. A única variável que o biótipo resistente demonstrou superioridade, foi a massa seca de raízes. Quanto a estruturas reprodutivas, taxa de crescimento e demais variáveis, manteve-se a superioridade do biótipo sensível. A resistência cruzada a inibidores da ALS resultou em uma diferença de crescimento, que deve ser melhor avaliada, já que as populações apresentam grande diferença genética.

Palavras-chave: Fenologia, *Raphanus raphanistrum*, competição.

5.2 ABSTRACT

The resistance of a weed to herbicide may be accompanied by some ecological disadvantage, which can make it difficult to establish the resistant biotype when the herbicide is not used. Thus, the work aimed to evaluate the growth and phenology of two *Raphanus raphanistrum* biotypes. The research was conducted from August to December 2020, with two simultaneous experiments, with the susceptible and resistant biotype in isolated cultivation or in competition with wheat. The parameters evaluated were: plant height, number of leaves, leaf area, shoot dry mass, growth rate, leaf area ratio, net assimilation rate and phenology determined by the BBCH scale. The results indicated a greater development and growth of the sensitive biotype in relation to the resistant biotype, in addition to a precocity of this biotype. The only variable that the resistant biotype showed superiority was root dry mass. As for reproductive structures, growth rate and other variables, the superiority of the sensitive biotype was maintained. Cross-resistance to ALS inhibitors resulted in a difference in growth, which should be better evaluated, as populations have a great genetic difference.

Keywords: Phenology, *Raphanus raphanistrum*, competition.

5.3 INTRODUÇÃO

Desde o início da agricultura e da pecuária, as plantas que infestavam espontaneamente as áreas de ocupação humana e não eram utilizadas como alimentos, fibras ou forragem foram consideradas indesejáveis (PITELLI, 2015). Essas plantas, em termos de nomenclatura botânica, são consideradas pioneiras, ou seja, plantas evolutivamente adaptadas para a ocupação de áreas onde, por algum motivo, a vegetação original foi profundamente alterada, ocorrendo grande disponibilidade de habitats ao crescimento vegetal. Elas têm a função de criar habitats adequados ao início de uma sucessão de populações, que culmina no restabelecimento da vegetação original (PITELLI, 2015).

As plantas daninhas competem com as culturas de interesse pela mecanismo chamado interferência, a interferência varia de acordo com os fatores ligados à cultura (espécie, cultivar e população de plantas), à comunidade infestante (composição específica, densidade e distribuição), ao manejo adotado (tanto para a cultura quanto para as plantas daninhas) e ao período de convivência entre cultura e comunidade infestante (época e duração), sendo todos esses fatores condicionados pelas condições edafoclimáticas do ambiente de produção (BACHEGA et al. 2013)

Com a evolução de populações de difícil controle, o valor adaptativo de alelos resistentes pode ser acompanhado da existência de custos de adaptação. Estes efeitos pleiotrópicos podem ser negativos ou positivos em dado ambiente, dependendo do alelo relacionado (DÉLYE et al., 2013). Quanto à capacidade competitiva dos biótipos resistentes em relação aos suscetíveis – o que muitas vezes determina a proliferação do biótipo na ausência do agente selecionador, a capacidade de extração e acúmulo de nutrientes pelas plantas, bem como o desempenho fisiológico, podem ser fatores importantes na capacidade competitiva dos biótipos (GALON et al. 2013). Estudos preliminares realizados por Ferreira et al. (2006) evidenciaram que o biótipo resistente de azevém que ocorre na região Sul do Brasil possui menor capacidade competitiva do que o biótipo suscetível ao glyphosate. Essa capacidade competitiva de uma planta sobre outra afeta negativamente a quantidade e a qualidade da produção, bem como a eficiência de aproveitamento dos recursos do ambiente. As diferenças na habilidade competitiva entre biótipos normalmente estão relacionadas às características fisiológicas, associadas ao uso da água e da radiação solar pelas espécies vegetais (MELO et al. 2006)

A hipótese de que biótipos resistentes a herbicidas possuem menor habilidade competitiva do que biótipos suscetíveis surgiu de observação em biótipos resistentes aos

herbicidas pertencentes ao grupo químico das triazinas. Esses biótipos apresentam menor taxa de crescimento e capacidade reprodutiva em relação aos biótipos suscetíveis. Na ausência do herbicida, a mutação encontrada na proteína D1 que conferiu resistência aos herbicidas também prejudicou a eficiência fotossintética do biótipo resistente (JASIENIUK et al., 1996).

Costa e Rizzardi (2015), estudaram a eficiência de dois biótipos de nabiça (um resistente e outro suscetível) com competição a cultura do trigo, os autores observaram semelhança entre os biótipos. Os trabalhos envolvendo a competição de biótipos de nabiça com a cultura do trigo são predominantes, resta a determinação do crescimento em condições livres de competição. Na Austrália, Goggin et al (2019), não encontraram custo ecológico de resistência envolvendo biótipo de *R. raphanistrum* resistente a herbicidas mimetizadores de auxinas.

Em geral, a resistência de plantas daninhas a inibidores de ALS não é associada a custo adaptativo do biótipo resistente. Sob condições livres de competição, genótipos de *Kochia scoparia* resistentes e suscetíveis a herbicidas do grupo químico sulfonilureia tiveram crescimento e germinação de sementes semelhantes. No entanto, em termos de competição, os genótipos apresentaram redução da massa seca da parte aérea, na competição interespecífica mais do que em intraespecífico, ocorrendo diferença entre os biótipos R e S (THOMPSON et al. 1994). Uma comparação do desenvolvimento de plantas daninhas na ausência de competição é crucial para estimar a adaptabilidade ecológica de biótipos resistentes e suscetível a herbicidas (CHRISTOFFOLETI et al., 1997).

O conhecimento da ecofisiologia dos biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS é importante para que possam ser recomendadas medidas de manejo à resistência (RIZZARDI et al. 2002). Nesse sentido, Christoffoleti (2001) salienta que na ausência de diferenças em habilidade competitiva entre biótipos resistentes e suscetíveis, devam ser adotadas estratégias preventivas à seleção de biótipos resistentes, pois, uma vez selecionado um biótipo resistente, a população não retorna naturalmente à frequência original de suscetibilidade.

A partir dos experimentos anteriores, nos ensaios de dose resposta, observou-se um desenvolvimento diferenciado quanto ao crescimento entre os biótipos; o biótipo resistente apresentava um crescimento menor e mais lento, levando-se a hipótese de que a resistência possa ter comprometido a capacidade de crescimento do biótipo. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a fenologia de dois biótipos de *R. raphanistrum*, um suscetível e outro resistente a herbicidas inibidores da enzima ALS.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Obtenção do material

As sementes dos biótipos resistente (R) de *R. raphanistrum* foram obtidas dos ensaios de dose resposta, que eram da região Oeste do Paraná, município de Catanduvas (25°21'26"S, 53°08'51"O e 752m), as sementes foram oriundas de três autofecundações. O biótipo suscetível (S), foi coletado em Lages-SC, em área não-agrícola e sem histórico de aplicação de herbicidas, localizada no Centro de Ciências Agroveterinárias (27°47'36"S, 50°18'08"O e 914m), onde apenas se realiza a roçada para controle de plantas daninhas. Para o biótipo S foram coletadas todas as síliquas maduras em dez plantas.

5.4.2 Condução

Os experimentos foram conduzidos inicialmente em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UEDESC), após atingirem o florescimento as unidades experimentais, foram retiradas da casa de vegetação e conduzidas em condições ambientais, para facilitar a fecundação e manter a produção de sementes o mais próximo da condição natural.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com tratamentos organizados em esquema fatorial, em que, fator A consistiu em biótipos de nabiça R e S, e o fator B os períodos de avaliações: 12, 25, 50, 75, 100 e 125 DAE (dias após a emergência), o experimento foi conduzido com 4 repetições. Foram conduzidos dois experimentos concomitantes, um experimento buscou avaliar o crescimento dos dois biótipos sem competição, ou seja, conduzindo os biótipos de nabiça livre da presença de outras espécies. O outro experimento foi conduzido em condição de competição com a cultura do trigo, simulando a interferência que ocorre a campo. Os experimentos foram semeados e conduzidos durante o mesmo período, de agosto a dezembro de 2020, totalizando um ciclo total de 118 dias.

As unidades experimentais consistiram em vasos plásticos com capacidade volumétrica de 3 dm³ que foram preenchidos com substrato comercial MecPlant® e adubação equivalente a 400 kg ha⁻¹ da formulação NPK 09-33-12. No experimento de competição foi utilizada a cultivar de trigo TBIO Toruk na densidade de 9 plantas por vaso, o que equivale a densidade recomendada para

cultura, que é de 300 plantas m². Em todos os experimentos a densidade de nabiça foi de uma planta por vaso, o que equivale a uma infestação de 30 plantas m².

A semeadura foi realizada no mesmo momento, para assim simular ao máximo a condição de crescimento natural das plantas, as sementes de trigo foram tratadas com Standak top[®] (pyraclostrobin, thiophanate methyl e fipronil). As sementes dos biótipos de nabiça foram tratadas com inseticida e fungicida, além de Proggib[®], ingrediente ativo, ácido giberélico (40 %), na concentração final de 5 %. Este hormônio vegetal foi utilizado para quebra de dormência e garantir a germinação da nabiça, principalmente no biótipo R que a semente havia sido colhida recentemente. Após a estabilização da germinação (7 dias após a semeadura - DAS), foi realizado o raleio das unidades experimentais, uniformizando a densidade de plantas.

Partindo-se da estabilização da emergência, aos 7 DAS, iniciou-se a contabilização do tempo para avaliação dos biótipos. No experimento com cultivo solteiro, as avaliações iniciaram nos 12 DAE, já no experimento de cultivo em competição iniciaram em 25 DAE. Para avaliar a produção de sementes foram conduzidos dois tratamentos até o final do ciclo, com biótipo resistente e suscetível, em cultivo solteiro.

Os dois experimentos consistiram em 24 tratamentos, sendo 96 parcelas experimentais, os tratamentos consistiram em combinação entre os biótipos suscetível e resistente com períodos de avaliação após a emergência, que representavam o crescimento até o período. Para avaliação da produção de sementes os tratamentos foram mantidos dentro do mesmo experimento até a finalização do ciclo. Os experimentos foram conduzidos com irrigação diária intermitente e manutenção constante para evitar o ataque de pragas e doenças, a fim de evitar possíveis interferências.

5.4.3 Avaliação e Análise Estatística

Em cada avaliação foram feitas avaliações destrutivas, sendo avaliadas a morfologia das plantas e estágio fenológico. Foram feitas avaliações de altura de plantas, número de folhas, massa seca da parte aérea, do sistema radicular, das estruturas reprodutivas (botões florais, flores e síliquas) e de toda a planta. A massa seca foi obtida com secagem em estufa a 65°C, mantidas até a estabilização da massa. Avaliou-se também a área foliar das plantas através de medidor de área foliar de bancada do modelo LI-3100. A produção de sementes foi avaliada com a coleta total das sílicas das plantas e debulha manual, após a debulha foram contabilizadas a quantidade de sementes e a massa das sementes e determinada a massa de 100 sementes, obtidas com balança de precisão (0,001g).

A partir dos dados obtidos forma calculadas através de equações de avaliação de crescimento a performance dos biótipos; as informações obtidas são fundamentais para o melhor entendimento sobre o crescimento dos biótipos, sendo calculados a taxa de crescimento relativo (TCR), taxa assimilatória aparente (TAA), razão de área foliar (RAF) e o índice de área foliar (IAF).

$$TCR = \frac{LN(MS2) - LN(MS1)}{T2 - T1}$$

$$TAA = \frac{(MS2 - MS1)}{T2 - T1} * \frac{LN(AF2) - LN(AF1)}{AF2 - AF1}$$

$$RAF = \frac{AF2 + AF1}{MS2 + MS1}$$

$$IAF = \frac{AF}{AV}$$

Equações utilizadas para avaliar o crescimento: TCR: taxa de crescimento relativo, TAA: taxa assimilatória aparente, RAF: razão de área foliar, IAF: índice de área foliar, MS: massa seca, T: tempo, AF: área foliar, AV: área do vaso.

As equações citadas acima são usualmente empregadas para avaliação do crescimento de plantas utilizadas por diversos autores, facilitando a comparação com a literatura; essas equações foram citadas por Brighenti et al (2001) que avaliou dois biótipos de amendoim-bravo, resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS.

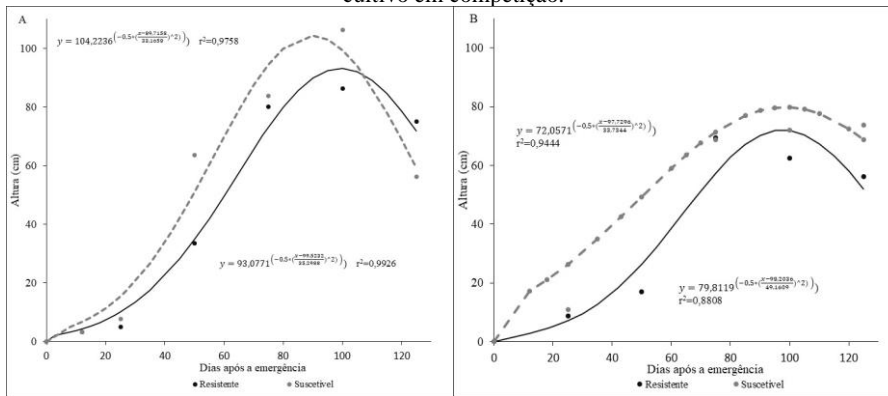
As análises estatísticas consistiram em análises de variância e análises de regressão. As equações de regressão foram ajustadas ao modelo Gaussiano (GUO, 2011). As variáveis produção de sementes por planta, número de sementes por planta e massa de 100 sementes foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por fim, foram realizadas avaliações de escala fenológica das plantas através da escala de BBCH (HESS et al, 1997). As avaliações foram realizadas semanalmente, onde eram visualizados o desenvolvimento dos biótipos de nabiça e correlacionado com o respectivo estágio da escala fenológica BBCH. As avaliações foram feitas separadas, para cada um dos biótipos, observando somente se os biótipos apresentam alguma diferença de tempo para atingir o mesmo estágio fenológico. A escala utilizada nesse estudo se aplica a diversas classes de plantas, onde cada classe apresenta uma escala diferenciada; no caso da nabiça foi utilizada a escala para plantas daninhas da classe das Magnoliopsidas.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorreu uma diferença de crescimento e desenvolvimento entre os dois biótipos, em todas as variáveis analisadas. Percebe-se uma diferença na altura de plantas entre os biótipos (Figura 5). No cultivo sem competição, o biótipo S apresentou maior precocidade e altura, atingindo mais de 100 cm aos 80 DAE (Figura 5). Enquanto o biótipo R apresentou menor crescimento, apresentou ciclo mais longo e manteve a estatura em maior tempo, a altura máxima do biótipo R foi de 92 cm e ocorreu aos 105 DAE (Figura 5). Na condição de competição as diferenças foram minimizadas, os dois biótipos tiveram o crescimento afetado pela interferência da cultura do trigo. Mesmo assim o biótipo R manteve a desvantagem competitiva.

Figura 5 – Altura (cm) dos biótipos de nabíça resistente e suscetível, A: cultivo solteiro e B: cultivo em competição.



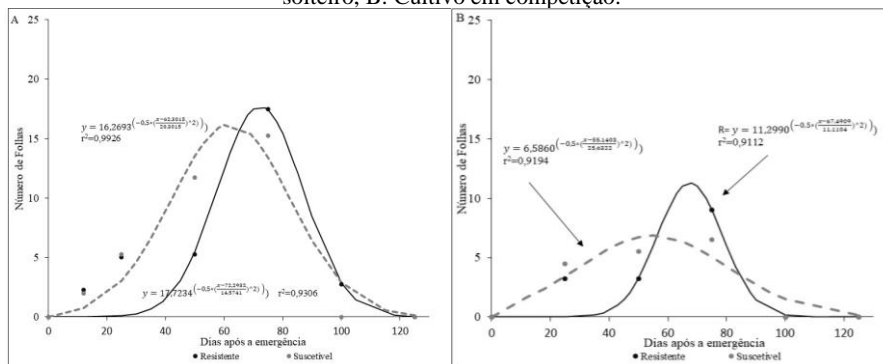
Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

Em avaliações de biótipo de leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) resistente a herbicidas inibidores da ALS, Brighenti et al. (2001) não observaram variação pronunciada na altura de plantas entre os biótipos e a conclusão final foi que os biótipos R e S apresentam crescimento e desenvolvimento parecidos, não havendo custo adaptativo da resistência. Rampelotti et al. (2003) também não observaram diferenças acentuadas na altura de plantas de biótipos de *Sagittaria montevidensis* (R e S) aos herbicidas inibidores de ALS. Contudo, os autores fizeram uma colocação importante, que em observações prévias este efeito era existente e visível, e que uma avaliação mais criteriosa poderia confirmar o custo adaptativo. Mariani et al (2016), avaliou a competitividade de biótipo de azevém resistente a inibidores de ALS com o trigo e relataram que o biótipo R teve um desempenho superior em estatura, mas a diferença não foi

muito acentuada. Esses autores propuseram que o valor adaptativo dos biótipos estudados é semelhante, também concluíram que o trigo possui maior habilidade competitiva que os biótipos avaliados. Na presente pesquisa não foram realizadas avaliações no trigo, mas em observações visuais ao longo do experimento percebeu-se a ampla vantagem competitiva da cultura frente aos biótipos de nabiça.

Os resultados de número de folhas (Figura 6) mostram os valores máximos de 15 folhas para biótipo S aos 60 DAE e 17 folhas aos 75 DAE no biótipo R, no cultivo solteiro; no cultivo em competição, os valores foram reduzidos, com máximo aos 55 DAE, com 7 folhas no biótipo S e 11 folhas aos 65 DAE no biótipo R.

Figura 6 – Número de folhas nos biótipos de nabiça resistente e suscetível. A: Cultivo solteiro, B: Cultivo em competição.



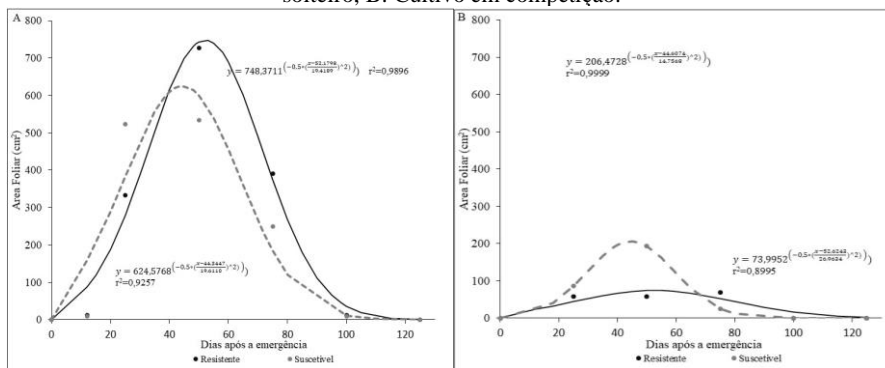
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Diferente dos dados obtidos nesse trabalho, Galvan, Rizzardi e Scheffer (2011) avaliaram biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate e obtiveram como resultado uma variação no número de folhas, onde dois biótipos resistentes apresentaram um número de folhas maior, enquanto outro biótipo resistente, apresentou número de folhas muito próximo ao biótipo suscetível utilizado. Os mesmos autores encontraram no trabalho uma senescência tardia do biótipo resistente e indicaram que esta senescência mais tardia significa alteração no ciclo, causadas por mudanças no metabolismo das plantas. Nesse aspecto, este trabalho também encontrou resultado semelhante.

Os biótipos também diferiram quanto ao incremento de área foliar ao longo do tempo. Na ausência de competição, a área foliar foi menor no biótipo R em comparação ao S nos primeiros 35 DAE (Figura 7A). O ciclo do biótipo S também foi mais precoce, bem como a manutenção de maior área foliar por mais tempo. Todavia, o biótipo R apresentou maior área

foliar, com 747 cm², contra 624 cm² no biótipo S (Figura 7A). A condição de competição com o trigo levou a perda de área foliar nos dois biótipos, mas com uma redução maior no biótipo R que acumulou no máximo 72 cm² de área foliar, contra 206 cm² no biótipo S, ou seja, uma área foliar quase 3 vezes menor (Figura 7B). Em suma, em condição de competição com a cultura do trigo, o biótipo R sofreu uma redução na área foliar maior que o biótipo S, configurando uma desvantagem ecológica da resistência.

Figura 7 – Área foliar (cm²) para os biótipos de nabiça suscetível e resistente. A: Cultivo solteiro, B: Cultivo em competição.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Outros trabalhos, envolvendo a comparação de biótipos resistentes e suscetíveis, sem competição tem comportamento variado para variável área foliar, os valores de área foliar são próximos e não ocorre uma diferença como nos resultados encontrados para os biótipos de nabiça. Christoffoleti (2001) avaliou biótipos de picão-preto R e S a herbicidas inibidores da ALS, obteve maior área foliar em biótipo S, o que concorda com resultado obtido neste trabalho, onde nos primeiros 40 dias de ciclo a área foliar do biótipo S foi superior.

Diferente do comportamento observado neste trabalho, em avaliação de biótipos de buva, *Conyza bonarienses* e *C. canadenses* resistentes e suscetíveis ao herbicida glyphosate, Moreira et al. (2010) obtiveram diferença entre os biótipos, sendo que no início do desenvolvimento, o biótipo resistente apresentou maior área foliar, porém no decorrer do ciclo o biótipo reduziu o desenvolvimento e a sua área foliar foi menor que o biótipo suscetível.

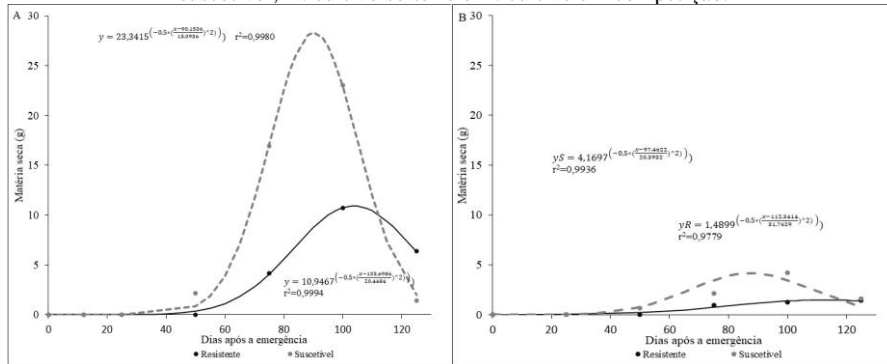
Para os valores de massa seca (MS) (Figura 8), ocorreram diferenças das mesmas formas que nas variáveis já descritas. No cultivo sem competição, o biótipo S, apresentou maior precocidade, atingindo o acúmulo máximo de MS mais cedo em todas as variáveis, também apresentou, maior MS total e parte aérea. Já o biótipo resistente, apresentou maior MS de raízes.

No cultivo em competição, o resultado foi mantido, contudo, o biótipo R sofreu mais com esse processo, visualizando uma maior distância entre as curvas de crescimento de MS parte aérea e total e uma menor distância para MS das raízes.

Tardif, Rajcan e Costea, (2005) trabalhando com biótipos de *Amaranthus powelli* R e S a inibidores de ALS, também encontraram que os biótipos R tiveram uma menor produção total de matéria seca e o desenvolvimento atrasado. Li et al. (2012) desenvolveram trabalhos investigando a resistência de biótipos de nabiça na Austrália, os biótipos R apresentavam resistência devido a mutação em apenas um aminoácido na enzima ALS, esses autores não observaram efeitos no crescimento nos biótipos de *R. raphanistrum* com resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

A produção de estruturas reprodutivas, sílicas e flores foi superior no biótipo S (Figura 9), pois esse biótipo produziu no total duas vezes mais estruturas reprodutivas que o biótipo R. A precocidade do biótipo S também foi mantida, tendo o seu florescimento e acúmulo de MS mais precoce que o biótipo R. Quanto ao impacto da competição, os dois biótipos foram afetados, mas o biótipo R, apresentou uma produção de estruturas reprodutivas muito baixa, chegando a no máximo 1,5 g por planta enquanto biótipo suscetível apresentou produção máxima de 4 g.

Figura 9– Matéria seca (g) das estruturas reprodutivas dos biótipos de nabiça resistente e suscetível, A: cultivo solteiro e B: cultivo em competição.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Esse menor crescimento evidenciado em todos os resultados obtidos faz com que em uma condição normal, sem a presença do agente de seleção (inibidor da ALS), o biótipo R apresente um crescimento reduzido e seja dominado na população. Em um cenário de cultivo de trigo, com a densidade de plantas utilizada neste trabalho, a nabiça seria suprimida em uma taxa maior que no biótipo S, gerando uma capacidade de interferência muito baixa a cultura do trigo.

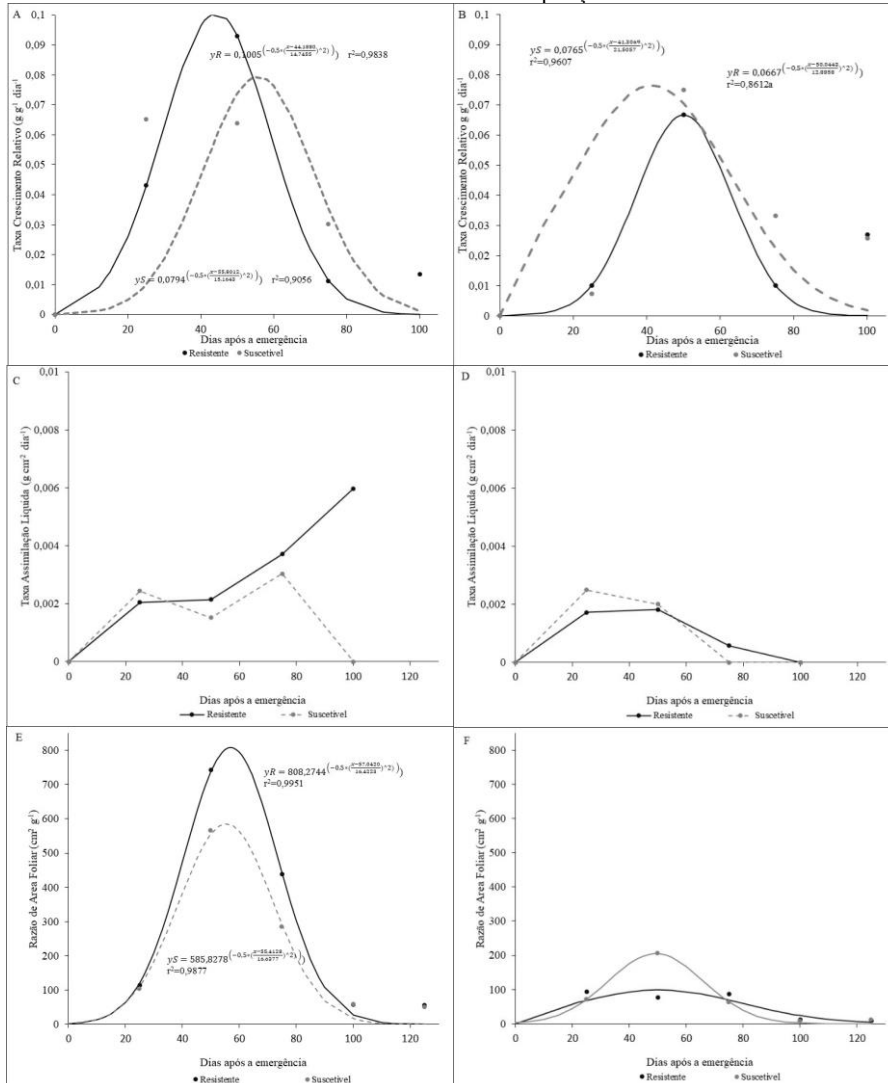
Os resultados obtidos para matéria seca de estruturas reprodutivas vão de encontro com os resultados já demonstrados, sendo o biótipo suscetível com uma produção muito superior de propágulos. A produção foi muito afetada pela competição, sendo que entre os dois biótipos, a competição reduz o crescimento em aproximadamente 90%. O benefício, práticas culturais adequadas a ela em relação a planta daninha, promoveu a redução da produção de sementes e consequente menor alimentação do banco de sementes do solo, que é o principal meio para infestações futuras de plantas daninhas.

Em trabalho com *Amaranthus powelli*, Tardif, Rajcan e Costea, (2006), buscaram verificar sobre efeitos da mutação a herbicidas inibidores de ALS no desenvolvimento e morfologia de diferentes biótipos, apresentaram várias afirmações, dentre elas que a diferença de competitividade causada pelo menor desenvolvimento inicial e alteração na morfologia reduz fortemente o acúmulo de biomassa e a reprodução quando as plantas R são cultivadas em competição, como nos resultados obtidos neste trabalho. Essa falta de competitividade resultou nas plantas resistentes produzindo muito menos biomassa acima do solo e de sementes ao competir com suscetíveis. Portanto, a característica de resistência a herbicidas parece ter um efeito negativo encontrado sobre a aptidão na ausência de herbicidas. Isso significa que a

proporção de plantas R em uma população mista pode ser mantida em um nível muito baixo em comparação com plantas suscetíveis a herbicidas do tipo selvagem quando a pressão de seleção de inibidores de ALS é retirada.

O parâmetro taxa de crescimento relativo ilustrou que no cultivo solteiro, o biótipo R apresentou um crescimento relativo superior (Figura 10A), isso provavelmente se deve ao maior desenvolvimento do sistema radicular da planta (equação considera a matéria seca total). No cultivo em competição, a taxa de crescimento relativo reforça o custo ecológico da resistência, com um crescimento muito superior do biótipo S, invertendo os resultados (Figura 10 B). Para a taxa assimilatória líquida os biótipos foram semelhantes, com exceção da avaliação de 100 DAE na condição livre de competição, em que o biótipo R manteve um ganho de crescimento enquanto houve decréscimo no biótipo S (Figura 10C e D). A razão de área foliar apresentou comportamento similar, no cultivo sem competição, o biótipo S, apresentou maior área aos 25 DAE, e após isso somente reduziu a sua razão, o biótipo R, apresentou valor máximo aos 50 DAE, apresentando uma redução mais drástica que o biótipo S. Já no cultivo em competição, o biótipo S, apresentou maior razão de área foliar em quase todo ciclo, assim como apresentou valor máximo superior; já o biótipo R apresentou razão máxima duas vezes menor, apresentando-se mais prejudicado pela competição, acumulando menos massa e área foliar na planta.

Figura 10 – Análises de crescimento dos biótipos de nabiça resistente e suscetível. A: taxa de crescimento relativo ($\text{g g}^{-1} \text{dia}^{-1}$) cultivo solteiro, B: Taxa de crescimento relativo cultivo em competição, C: Taxa assimilatória líquida ($\text{g cm}^2 \text{dia}^{-1}$) cultivo solteiro, D: Taxa assimilatória líquida cultivo em competição, E: Razão de área foliar ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) cultivo solteiro, F: Razão de área foliar cultivo em competição.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Schaedler et al.(2013) avaliaram biótipos de *Fimbristylis miliacea* com resistência a inibidores de ALS, resultados obtidos foram semelhantes a este trabalho onde os biótipos R apresentaram um desenvolvimento menor comparado ao biótipo S, assim concluíram que a espécie possui custo adaptativo.

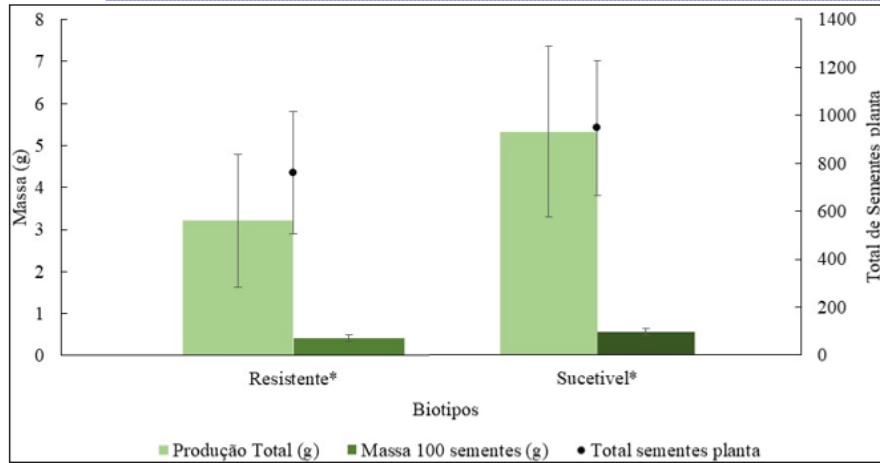
Algumas substituições que causam resistência a ALS resultam em uma redução na atividade de ALS e afinidade de substrato. No entanto, para outras mutações ALS, não há evidências de uma redução na atividade ALS, com relatos de nenhuma mudança na atividade da ALS (Pro-197-Thr) (PRESTON et al., 2006)

Para Vila-Aiub, Neve e Powles (2009) a mutação também pode prejudicar a atividade enzimática e/ou reduzir a afinidade do substrato (resultando em biossíntese de produto insuficiente). Atividade da ALS prejudicada foram encontradas na substituição Pro-197-His em *L. serriola* e *L. sativa*, e a substituição Ala-205-Val em *Solanum ptychanthum*. Em ambos os casos, o biótipo ALS resistente não mostra ligação de substrato alterada, mas uma redução próxima de 50% na atividade quando comparado com o biótipo S (ASHIGH; TARDIF, 2007).

A atividade ALS é regulada pelo acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada (MIFLIN; CAVE, 1972). As mutações ALS levam a uma diminuição da sensibilidade à inibição de quantidade por Val, Leu e, ou Ile. Uma possível consequência da sensibilidade de produtos reduzida para inibição é o acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada ácidos em tecidos vegetais. Um excesso e/ou desequilíbrio do *pool* de aminoácidos pode ter efeitos tóxicos no metabolismo celular, e se correlaciona bem com o crescimento reduzido da planta (HOFGEN et al., 1995).

A produção de sementes foi diferente entre os biótipos; embora não tenha sido registrada diferença significativa, em média, o biótipo S apresentou maior produção de sementes, número de sementes por planta e a massa de 100 sementes (Figura 11). Uma planta de nabiça gera uma grande quantidade de sementes que ficam viáveis por longos períodos no banco de sementes do solo.

Figura 11 – Avaliação da produção de sementes nos biótipos de nabiça resistente e suscetível.



*não significativo pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Comentado [RV1]: Não seria figura 11? Me envie essa figura para eu trabalhar com a formatação.

Comentado [DLF2R1]: Essa figura é a junção de dois gráficos, o que o professor indica mudar?

A fenologia dos biótipos de nabiça, feita a partir escala de BBCH demonstra a diferença entre o ciclo de vida dos biótipos (Tabela 11). A principal diferença observada é que o biótipo R apresentou ciclo superior, assim todas as mudanças fenológicas do biótipo foram mais tardias, comparadas ao biótipo S. A diferença principal observada no início do ciclo foi o alongamento da fase de roseta, que no biótipo R levou um tempo maior, teve uma diferença de 9 dias entre os biótipos. Para secagem das sílicas a diferença foi de 7 dias, com essa desvantagem de ciclo mais tardio, plantas do biótipo R, tendem a ser suprimidas em uma população de *R. raphanistrum*.

Tabela 10 – Ciclo e estágios fenológicos observados para os biótipos de nabiça.

Suscetível		Resistente	
DAE	BBCH	Estágio	Estágio
0	0	Semeadura	Semeadura
9	1	Emergência	Emergência
16	2	Desenvolvimento da folha	Desenvolvimento da folha
22	3	Formação de brotos laterais	Formação de brotos laterais
24	4	Alongamento da roseta	Alongamento da roseta
27	5	Desenvolvimento das partes de propagação	Desenvolvimento das partes de propagação
45	6	Inflorescência	Inflorescência
55	7	Florescimento	Florescimento
76	8	Desenvolvimento dos frutos e Amadurecimento dos frutos e sementes	Desenvolvimento dos frutos e Amadurecimento dos frutos e sementes
100	9	Senescência	Senescência
1 - Desenvolvimento da folha			
1	10	Primeira folha emergida no coleóptilo	Primeira folha emergida no coleóptilo
12	11	Primeira folha verdadeira	Primeira folha verdadeira
14	12	2 Folhas verdadeiras, pares de folhas ou espirais dobrados	2 Folhas verdadeiras, pares de folhas ou espirais dobrados
16	13	3 Folhas verdadeiras, pares de folhas ou espirais dobrados	3 Folhas verdadeiras, pares de folhas ou espirais dobrados
25	19	9 ou mais folhas verdadeiras, pares de folhas ou espirais dobrados	9 ou mais folhas verdadeiras, pares de folhas ou espirais dobrados
5 – Inflorescência			
24	51	Inflorescência ou partes visíveis	Inflorescência ou partes visíveis
25	55	Primeiras flores visíveis	Primeiras flores visíveis
27	59	Primeiras pétalas nas folhas	Primeiras pétalas nas folhas
6 – Florescimento			
27	60	Primeira flor visível	Primeira flor visível
43	65	50% flores abertas	50% flores abertas
52	67	Final do florescimento	Final do florescimento
55	69	Final do florescimento e frutos visíveis	Final do florescimento e frutos visíveis
7 - Desenvolvimento de Frutos			
62	71	10 % dos frutos em tamanho final	10 % dos frutos em tamanho final
75	75	50 % dos frutos em tamanho final	50 % dos frutos em tamanho final
88	79	Todos os frutos em tamanho final	Todos os frutos em tamanho final
8 - Maturação dos frutos e sementes			
70	81	Início do amadurecimento	Início do amadurecimento
81	85	Amadurecimento avançado	Amadurecimento avançado
104	89	Início da abscisão do fruto	Início da abscisão do fruto
9 – Senescência			
74	91	Desenvolvimento de ramos concluído, folhas ainda verdes	Desenvolvimento de ramos concluído, folhas ainda verdes
75	93	Início da queda das folhas	Início da queda das folhas
85	95	50% das folhas caídas	50% das folhas caídas
100	97	Fim da queda das folhas, plantas ou partes acima do solo mortas ou dormentes	Fim da queda das folhas, plantas ou partes acima do solo mortas ou dormentes
118	99	Colheita	Colheita

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

5.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o biótipo resistente apresentou uma diferença de crescimento em relação ao biótipo suscetível. Sendo que em condição de interferência com a cultura do trigo a diferença de crescimento é acentuada, mas devido à grande diversidade genética entre as populações não se pode estipular a existência de custo ecológico, necessitando de mais estudos para essa comprovação.

A escala de BBCH adaptada para *Raphanus raphanistrum* auxiliou no entendimento da fenologia da espécie.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHIGH, J.; TARDIF, F. J. An Ala205Val substitution in acetohydroxyacid synthase of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science**, v. 55, n. 6, p. 558-565, 2007.
- BACHEGA, L.P.S et al. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do quiabo. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 63-70, 2013.
- BRIGHENTI, A.M. et al. Análise de crescimento de biótipos de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 19, n. 1, p. 51-59, 2001.
- COSTA, L. O.; RIZZARDI, M. A. Competitive ability of wheat in association with biotypes of *Raphanus raphanistrum* L. resistant and susceptible to ALS-inhibitor herbicides. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 2, p. 121-130, 2015.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. Análise comparativa do crescimento de biótipos de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 19, n. 1, p. 75-83, 2001.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; WESTRA, P.; MOORE, F. Growth analysis of sulfonylurea-resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, v. 45, n. 5, p. 691-695, 1997.
- DÉLYE, C. et al. A new insight into arable weed adaptive evolution: mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. **Annals of Botany**, v. 111, p. 681-691, 2013.
- FERREIRA, E. A. et al. Translocação de glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 365-370, 2006.
- GALVAN, J; RIZZARDI, M.A; SCHEFFER-BASSO, S. Aspectos morfofisiológicos de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) sensíveis e resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1107-1112, 2011.
- GALON, L. et al. Características fisiológicas de biótipos de *Conyza bonarienses* resistentes ao glyphosate cultivados sob competição. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 859-866, dez. 2013.
- GOGGIN, D. E. et al. No auxinic herbicide-resistance cost in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Science**, v. 67, n. 05, p. 539-545, 2019.
- GUO, H. A Simple algorithm for fitting a gaussian function [DSP tips and tricks]. **Ieee Signal Processing Magazine**, v. 28, n. 5, p. 134-137, 2011.
- HESS, M. et al. Use of the extended BBCH scale - general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, v. 37, n. 6, p. 433-441, 1997.

- HOFGEN, R. et al. Repression of acetolactate synthase activity through antisense inhibition (molecular and biochemical analysis of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. cv Desiree) Plants). **Plant Physiology**, v. 107, n. 2, p. 469-477, 1995.
- JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, n. 1, p. 176-193, 1996.
- LI, Mei et al. ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p. 689-695, 2012.
- MARIANI, F. et al. Valor adaptativo e habilidade competitiva de azevém resistente e suscetível ao iodosulfuron em competição com o trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 6, p. 710-719, 2016.
- MIFLIN, B. J.; CAVE, P. R. The Control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 23, n. 2, p. 511-516, 1972.
- MELO, P. T. B. S. et al. Comportamento de populações de arroz irrigado em função das proporções de plantas originadas de sementes de alta e baixa qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 1, p. 37-43, 2006.
- MOREIRA, M. S. et al. Crescimento diferencial de biótipos de *Conyza spp.* resistente e suscetível ao herbicida glifosato. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 591-598, 2010.
- PITELLI, R. A. O termo planta-daninha. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 622-623, 2015.
- PRESTON, C. et al. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 3, p. 227-235, 2006.
- RAMPELOTTI, F.T. et al. Análise de crescimento de ecótipos de sagitária (*Sagittaria montevidensis*) resistente e suscetível a herbicidas inibidores da ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3., 2003, Balneário Camboriú, SC. Anais. Itajaí: EPAGRI, p.483-485, 2003.
- RIZZARDI, M.A. et al. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 149-158, 2002.
- SCHAEDLER, C. E. et al. Germination and growth of *Fimbristylis miliacea* biotypes resistant and susceptible to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p. 687-694, 2013.
- TARDIF, F. J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. **New Phytologist**, v. 169, n. 2, p. 251-264, 2005.
- THOMPSON, C. R.; THILL, D. C.; SHAFII, B. Growth and competitiveness of sulfonylurea-resistant and -susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, v. 42, n. 2, p. 172-179, 1994.

VILA-AIUB, M. M. NEVE, P., POWLES, S. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 751-767, 2009.

6 ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DE NABIÇA COM RESISTÊNCIA CRUZADA A INIBIDORES DA ALS

6.1 RESUMO

A nabiça vem figurando como uma importante planta daninha em diversas culturas devido a elevada competitividade e a presença de biótipos resistentes. Este trabalho teve como objetivo buscar herbicidas alternativos para o controle químico de um biótipo de nabiça com resistência cruzada a inibidores da ALS. O trabalho foi desenvolvido com todos os herbicidas registrados a cultura do trigo, exceto inibidores de ALS, aplicados em pré ou pós-emergência e avaliação de controle e matéria seca, no biótipo resistente. O trabalho demonstrou que as alternativas de controle químico disponíveis na cultura do trigo possuem eficiência para realizar o controle, embora alguns não sejam seletivos a cultura, com elevada eficiência, como o mecanismo de resistência elucidado refere-se a uma mutação no sítio de ação dos herbicidas inibidores de ALS, qualquer mecanismo de ação diferente, proporciona eficiência no controle, todos os herbicidas apresentam potencial uso, mas deve-se sempre buscar a etapa da dessecação onde o leque de produtos é maior. Conclui-se que os herbicidas alternativos possuem elevada eficiência e são alternativas para o controle químico de nabiça resistente a ALS.

Palavras-chave: Controle alternativo, manejo, dessecação.

6.2 ABSTRACT

The wild radish plant has figured as an important weed in several cultures due to its high competitiveness and the presence of resistant biotypes. This work aimed to search for alternative herbicides for the chemical control of a wild radish biotype with cross-resistance to ALS inhibitors. The work was developed with all herbicides registered to wheat, except ALS inhibitors, applied in pre- or post-emergence and evaluation of control and dry matter, in the resistant biotype. The work demonstrated that the chemical control alternatives available in the wheat crop are efficient to carry out the control, although some are not selective to the crop, with high efficiency, as the resistance mechanism elucidated refers to a mutation in the site of action of the ALS-inhibiting herbicides, any different mechanism of action, provides efficient control, all herbicides have potential use, but the desiccation stage where the range of products is greater should always be sought. It is concluded that alternative herbicides have high efficiency and are alternatives for the chemical control of ALS-resistant turnip.

Keywords: Alternative control, management, desiccation.

6.3 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Raphanus* estão presentes em várias culturas agrícolas, devido as suas habilidades competitivas e adaptação a diversos ambientes. Além de germinarem no inverno, também podem germinar no verão, sendo consideradas espécies facultativas (MADHOU et al., 2005).

A enzima aceto-hidroxiácido sintase (AHAS/ALS) é a primeira enzima na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, valina e leucina. A inibição da ALS, leva a inibição da produção destes aminoácidos e a morte da planta. Cinco grupos químicos diferentes fazem parte dos inibidores da ALS, sulfoniluréia (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidina (TP), pirimidinilbenzoatos (PB) e sulfonilaminocarboniltriazolinonas (SACT) sendo os quatro primeiros comercializados no Brasil (QUEIROZ; VIDAL; MEROTTO JUNIOR, 2013). No Brasil, esses herbicidas são registrados pelo Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para culturas agrícolas de grande importância (BRASIL, 2021). Dos ingredientes ativos registrados no Brasil, os herbicidas inibidores da ALS representam 31% em arroz; 24% em cana-de-açúcar; 14% em soja; 13% em milho; 11% em feijão, 6% em algodão, 19% em trigo e 25% nos demais cereais de inverno (BRASIL, 2021). Além disso, constituem grande parte dos produtos disponíveis para o controle de plantas daninhas em culturas de inverno, com maior relevância na região Sul do Brasil.

O controle de plantas daninhas resistentes é o maior desafio atual. A cada dia são registrados novos casos de resistência e elucidados os mecanismos de resistência. O manejo mais comum e aceito para controlar plantas daninhas resistentes, além da utilização de práticas integradas, é a utilização de herbicidas pertencentes a outros mecanismos de ação. Para tal fim, é importante conhecer bem o mecanismo de ação do herbicida utilizado e se há ou não evolução para resistência múltipla (WALSH; POWLES, 2014).

O objetivo deste trabalho foi buscar alternativas de manejo de nabiça resistente com a utilização de herbicidas de outros mecanismos de ação alternativos inibidores de ALS, na cultura do trigo.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC (CAV-UDESC), em Lages-SC, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, cada unidade experimental foi representada por uma planta em um vaso plástico com capacidade volumétrica de 0,4 dm³, neste experimento, somente foi utilizado o biótipo resistente, já que o biótipo suscetível, ainda apresenta controle com inibidores de ALS.

Os herbicidas alternativos estudados, foram aplicados em duas modalidades, pré-emergência e pós-emergência. Em pré-emergência avaliou-se: pendimethalin (1820 g i.a. ha⁻¹), flumioxazin (75 g i.a. ha⁻¹) e clomazone (432 g i.a. ha⁻¹). Em pós-emergência foram avaliados: 2,4-D (564,2 g i.a. ha⁻¹), MCPA (732 g i.a. ha⁻¹), dicamba (720 g i.a. ha⁻¹), bentazon (576 g i.a. ha⁻¹), glyphosate (2095,65 g i.a. ha⁻¹), metribuzin (144 g i.a. ha⁻¹), saflufenacil (49 g i.a. ha⁻¹), glufosinate (400 g i.a. ha⁻¹), paraquat (400 g i.a. ha⁻¹), triclopyr (1360 g i.a. ha⁻¹) e flumioxazin (50 g i.a. ha⁻¹). Dessa maneira foram avaliados um total de 15 tratamentos, sendo 14 herbicidas e a testemunha não tratada.

Quando a maioria das plantas atingiram o estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas verdadeiras, as unidades experimentais foram retiradas da casa de vegetação para aplicação dos tratamentos. No caso da aplicação em pré-emergência, foram semeadas 5 sementes por unidade experimental, realizada a irrigação e logo em seguida a aplicação dos herbicidas, nestas parcelas utilizou-se solo agrícola como substrato. Esse procedimento foi feito para simular as condições de campo em que o solo é o alvo da aplicação. A aplicação foi realizada com pulverizador costal de precisão, pontas jato plano AD 110 02, na altura de 50 cm acima do alvo, pressão de 220 KPa com volume de aplicação de 200 L ha⁻¹. Após a aplicação dos herbicidas, os vasos foram levados para a casa de vegetação, permanecendo sem irrigação por 24 horas a fim de não interferir na absorção do herbicida.

Avaliou-se o controle aos 28 dias após aplicação (DAA) nos tratamentos aplicados em pós-emergência. Nessa mesma data, nos tratamentos aplicados em pré-emergência avaliou-se o número de plantas emergidas por unidade experimental, e convertendo em eficiência de controle em relação a testemunha não tratada. Utilizou-se como base a escala percentual, em que a nota 0% correspondeu a nenhum efeito do herbicida e a nota 100% significou morte das plantas. A matéria seca da parte aérea (MSPA) também foi avaliada, cortando-se rente ao solo, todas as plantas do vaso aos 28 DAA e, posteriormente, secadas em estufa a 65 °C por 72 horas até peso constante, quando foi realizada a quantificação da MSPA em balança de precisão




(0,001 g). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$). Quando significativo realizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de variância foi significativa para todas as variáveis analisadas, nas duas modalidades de aplicação, pré e pós-emergência (Tabela 10). Na pré-emergência, os herbicidas flumioxazin e clomazone foram mais eficientes no controle, com sobrevivência de 0 e 17,5 % em relação a testemunha (Tabela 10). O herbicida pendimethalin, apresentou controle muito baixo, a sobrevivência obtida foi de 75%. Esse herbicida apresenta um Kow elevado, esse valor representa a afinidade do mesmo com compostos orgânicos, o solo utilizado, possui elevado teor de matéria orgânica e também considerado muito argiloso. Assim, o herbicida, que tem maior afinidade por esses componentes se liga e não fica livre na solução, com capacidade de controle das plantas daninhas. Kalsing e Vidal (2012), também obtiveram menor eficiência de controle com uso de pendimethalin em solos argilosos e com alto teor de matéria orgânica. Quanto aos valores de matéria seca, flumioxazin e clomazone reduziram a produção a praticamente zero, já pendimethalin demonstrou menor eficiência, semelhante ao controle.

Tabela 11 – Controle (%), sobrevivência (%) e massa seca da parte aérea (g vaso⁻¹) do biótipo de *R. raphanistrum* resistente a inibidores de ALS, com herbicidas alternativos aos 28 DAA.

Pré-Emergência	Dose (g.ia. ha ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Controle (%)	MS (g)	NC
Testemunha		100 a	-	0,05 ab	
Pendimethalin	2000	75 ab	-	0,1 b	
Flumioxazin	75	0 c	-	0,0 a	
Clomazone	432	17 bc	-	0,005 a	
CV (%)		60,61	-	74,44	
Pós-Emergência					
Testemunha		-	0 a	2,63 a	
2,4-D	564,2	-	100 c	0 b	
MCPA	732	-	100 c	0 b	
Dicamba	720	-	88 bc	0,35 b	
Bentazon	720	-	100 c	0 b	
Glyphosate	2095,62	-	100 c	0 b	
Metribuzin	144	-	67 b	0,74 b	
Saflufenacil	49	-	99 c	0,05 b	
Glufosinate	400	-	100 c	0 b	
Paraquat	400	-	100 c	0 b	
Triclopyr	1360	-	100 c	0 b	
Flumioxazin	50	-	77 bc	0,7 b	
CV (%)		-	11,8	126,60	

Obs:  <60% controle,  controle >60% e <80% e  >80% controle.

Sobrevivência: conforme o número de plantas; NC: Nível de controle

Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

Na pós-emergência, a maioria dos herbicidas alternativos apresentaram controle muito bom ou excelente (>88%), todos apresentam diferença significativa a testemunha. Os únicos tratamentos que não apresentaram controle satisfatório foram metribuzin (67%) e flumioxazin (77,5%) (Tabela 10). Os demais apresentaram níveis de controle superior a 88%, sendo que a maioria apresentou 100% de controle. Quanto as avaliações de matéria seca da parte aérea, todos os herbicidas diferiram da testemunha e apresentaram redução, não ocorrendo diferença significativa entre os mesmos (Tabela 10).

Costa e Rizzardí (2013) avaliaram o controle alternativo de biótipo de nabiça oriundo do Norte do Paraná, com resistência metsulfuron-methyl, obtiveram resultados semelhantes a este trabalho, onde, glyphosate, bentazon e 2,4-D, apresentaram controles muito próximos a 100%.

Neste trabalho nem todos os herbicidas utilizados são seletivos a cultura, no caso, glyphosate, saflufenacil, glufosinate, paraquat e flumioxazin, não apresentam seletividade em pós-emergência. No entanto, podem ser usados na dessecação e manejo outonal de nabiça, no manejo outonal também podem ser utilizados os herbicidas auxínicos, que possuem elevada eficiência no controle. Quanto a aplicação com seletividade a cultura a disponibilidade de herbicidas pré ou pós-emergência, o pendimethalin apresenta seletividade e é registrado para cultura em aplicação de pré-emergência, flumioxazin apresenta seletividade (ASSUNÇÃO et al. 2017), porém, não é registrado para a cultura. Também pode ser incluído como potencial o clomazone, que não possui registro, mas se utilizada com o safener torna-se seletivo para a cultura do trigo (SCHMITZ et al., 2018).

Em pós-emergência restam apenas os herbicidas com modo de ação mimetizadores de auxina (2,4-D, MCPA, dicamba e triclopyr) e inibidores fotossistema II (bentazon e metribuzin). O saflufenacil pode ser utilizado em pós-emergência, embora cause elevada fitointoxicação a cultura (MALDANER; SCHENEIDER, 2019).

A partir da resistência restam apenas dois mecanismos para controle de nabiça em pós-emergência, a aplicação dos mimetizadores de auxina causa fitointoxicação na cultura e deve ser feita em momento específico, antes do alongamento do colmo das plantas de trigo, o que necessita de maior tecnificação no seu uso. Além disso, seu uso deve ser racional, pois já foram comprovadas resistência a estes modos de ação na Austrália com resistência múltipla (HEAP, 2021). Os inibidores do FSII, podem ser aplicados sem restrições, mas sempre deve-se buscar aplicação em estádios ideais de controle, já que possuem uma mobilidade reduzida, no caso do metribuzin, que é absorvido mais pelas raízes, deve-se ter o cuidado na aplicação de atingir corretamente o alvo.

Vidal e Merotto Jr, (1999) trabalharam com biótipo de *E. heterophylla* demonstraram resistência cruzada também aos inibidores de ALS, mas foi suscetível aos herbicidas glyphosate, 2,4-D, dicamba, paraquat, atrazina, fomasafen e lactofen. Cechin et al. (2016), comprovaram a resistência de biótipos de *R. sativus* ao iodosulfuron, avaliou alternativas para controle com glufosinate, paraquat, diuron + paraquat, glyphosate, saflufenacil, fomasafen, mesotrione, tembotrione e atrazine, pensando na presença em lavouras de milho e soja. Braz et al. (2011) avaliaram herbicidas alternativos ao controle de *B. pilosa* e *E. heterophylla* resistente a inibidores da ALS na cultura do algodão, obteve controle satisfatório com a mistura de inibidores de ALS, glyphosate e glufosinate, a mistura tripla apresentou sinergismo no controle.

O biótipo R deste trabalho não apresenta resistência múltipla a herbicidas, e os herbicidas alternativos testados podem ser utilizados para o controle, porém, mesmo sendo herbicidas eficientes, é necessário adotar diferentes estratégias a fim de evitar e prevenir a evolução para resistência múltipla.

6.6 CONCLUSÕES

O biótipo de nabiça com resistência cruzada a inibidores de ALS, foi controlado com eficiência pelos herbicidas flumioxazin, clomazone, aplicados em pré-emergência, e 2,4-D, MCPA, dicamba, bentazon, glyphosate, saflufenacil, glufosinate paraquat e triclopyr, aplicados em pós-emergência.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSUNÇÃO, N. S. *et al.* Seletividade do flumioxazin ao trigo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 16, n. 2, p. 122, 2017.
- BASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Sistema de agrotóxicos fitossanitários (AGROFIT). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>> Acesso: em 20 de março de 2021
- BRAZ, G. B. P. *et al.* Herbicidas alternativos no controle de *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla* resistentes a inibidores de ALS na cultura do algodão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 2, p. 74, 2011.
- CECHIN, J. *et al.* Resistance of radish biotypes to iodosulfuron and alternative control. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 151-160, 2016.
- CHRISTOPHER, J. T. *et al.* Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). **Plant Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1036-1043, 1991.
- COSTA, L. O. **Elucidação do mecanismo de resistência de *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS)**. 2017. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, UPF, Passo Fundo, 2017.
- COSTA, L. O.; RIZZARDI, M. A. Herbicidas alternativos para o controle de *Raphanus raphanistrum* L. resistente ao herbicida metsulfurom metílico. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 3, p. 268, 2013.
- KALSING, A.; VIDAL, R.A. Redução da infestação de papuã (*Urochloa plantaginea*) no feijoeiro comum através do uso de herbicidas residuais. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 575-580, 2012.
- HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. 2021. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/>>. Acesso em: 20 fev. 2021
- MADHOU, P. *et al.* Genetic variation in populations of Western Australian wild radish. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 10, p. 1079, 2005.
- MALDANER, R. L.; SCHENEIDER, T. Seletividade do herbicida saflufenacil ao trigo. **Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 47-54, 2019.
- QUEIROZ, A. R. S.; VIDAL, R. A.; MEROTTO JUNIOR, A. Fatores que possibilitam a redução da dose dos herbicidas inibidores da enzima ALS: revisão de literatura. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 23, p. 25-36, 2013.
- SCHMITZ, M. F. *et al.* Uso de clomazone associado ao safener dietholate para o manejo de plantas daninhas na cultura do trigo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 1, p. 02-11, 2018.
- TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, n.6, p.700-712, 2002.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o trabalho realizado conclui-se que o biótipo inicial com suspeita de resistência, é mesmo resistente e apresenta resistência cruzada, envolvendo todo grupo dos herbicidas inibidores da ALS. A resistência é causada pela mutação na enzima alvo na posição 574, o que resultou na substituição do triptofano por uma leucina (Trp-574-Leu), resultando em um fator de resistência elevado.

A análise de crescimento do biótipo de nabiça resistente a inibidores da ALS demonstrou que o mesmo apresenta uma diferença de crescimento, essa diferença deve ser mais bem estudada, para observar a presença do custo adaptativo.

Sabe-se da disponibilidade de outros herbicidas que foram verificados neste trabalho para controle de nabiça, principalmente os que controlam outras folhas largas também, como: MCPA, dicamba, glyphosate, glufosinate, bentazon, 2,4-D, metribuzin, saflufenacil, triclopyr, flumioxazin, clomazone e pendimethalin; deve-se além de utilizar estes herbicidas com diferentes modos de ação, buscar sempre priorizar o desenvolvimento da cultura, assim ela estará em vantagem frente as plantas daninhas.

O conhecimento e a investigação clara sobre os biótipos resistentes de plantas daninhas são importantes para elaboração de estratégias de manejo. Com todas essas informações, mesmo sendo confirmada a resistência, se tem uma facilidade na elaboração de diferentes manejos e é possível contribuir com a redução da interferência de plantas daninhas resistentes. A mesma ideia serve para outras plantas daninhas e culturas, deve-se buscar o máximo de informação para chegar ao ponto chave e adotar estratégias de manejo que reduzam a evolução da resistência.