

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

EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À DEGRADAÇÃO DE IMAZETHAPYR E
EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ EM CAPIM-
ARROZ

Giliardi Dalazen
Mestre em Agronomia/UFSM

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Dalazen, Giliardi
EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À DEGRADAÇÃO DE
IMAZETHAPYR E EFEITO DA TEMPERATURA E DA
CONCENTRAÇÃO DE CO2 EM CAPIM-ARROZ / Giliardi
Dalazen. -- 2016.
149 f.

Orientador: Aldo Merotto Jr.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Echinochloa crus-galli. 2. imidazolinonas. 3.
P450. 4. CYP81A6. 5. mudança climática. I. Merotto
Jr, Aldo , orient. II. Título.

GILIARDI DALAZEN
Engenheiro Agrônomo - UFSM
Mestre em Agronomia - UFSM

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 29.03.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 19.04.2016
Por

ALDO MEROTTO JUNIOR
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

RIBAS ANTONIO VIDAL
PPG Fitotecnia/UFRGS

ANDERSON LUIS NUNES
IFRS - Sertão, RS

ANDRÉ ANDRES
EMBRAPA Clima Temperado
Pelotas, RS

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

Dedico

À minha família, em especial
à minha querida mãe
Sebastiana (*in memoriam*).

“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King Jr.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Agronomia, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e ao Departamento de Plantas de Lavoura, pelo acolhimento, oportunidade e estrutura para que este trabalho fosse realizado.

Ao professor Aldo Merotto Jr., pela orientação, ensinamentos, amizade e compreensão em momentos delicados. O levarei como exemplo pessoal e profissional para a minha vida e carreira.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e outros PPGs onde cursei disciplinas, pelos ensinamentos e amizade.

Aos servidores e técnicos administrativos do Departamento de Plantas de Lavoura e do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela prestatividade, ajuda e amizade.

Aos professores e pesquisadores Albert J. Fischer, Marcelo M. Gravina, Nelson D. Kruse e Ribas A. Vidal, pela participação e colaboração na banca do exame de qualificação deste trabalho.

Aos professores e pesquisadores Anderson L. Nunes, André Andres e Ribas A. Vidal, pela participação e colaboração na banca de defesa deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pela bolsa de estudos e apoio financeiro concedidos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela amizade, conhecimentos compartilhados, momentos de descontração, momentos de apoio e pela

agradável convivência. Em especial, aos amigos Ana Paula, André, Andrew, Alexandre, Catarine, Cecília, Daniele, Gabriele, Juliano, Kelly, Mateus Gallon, Renan, Silmara e Tiago.

Aos alunos de iniciação científica Ari, Cátia, Christian, Débora, Emanuel, Guilherme, Laís, Mariah, Paula, Rafael e Samuel, pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram, mesmo que à distância, compreendendo a minha ausência em momentos especiais de nossas vidas.

À minha família, em especial ao meu pai Odi, minha mãe Sebastiana, meu irmão Letieri, minha cunhada Luana e minha sobrinha e afilhada Lara, pela motivação e pelo apoio incondicional desde os primeiros dias de minha vida. A gratidão que tenho por vocês não cabe nessas linhas.

À Lilian, minha namorada, pelo carinho, motivação e pelo apoio incondicional desde o dia em que nos conhecemos. Obrigado por ser minha companheira e amiga. Obrigado por ter compreendido minhas ausências. Obrigado por cuidar de mim. Obrigado por tudo.

À Deus, pela vida, e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À DEGRADAÇÃO DE IMAZETHAPYR E EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ EM CAPIM-ARROZ¹

Autor: Giliardi Dalazen
Orientador: Aldo Merotto Jr.

RESUMO

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas e a mudança climática são fatores que alteram a dinâmica das populações de plantas daninhas nos ambientes agrícolas. O melhor entendimento desses fatores é fundamental para que técnicas adequadas de manejo das plantas daninhas sejam empregadas. O objetivo deste trabalho foi identificar o mecanismo de resistência de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) e avaliar o efeito da temperatura e concentração de CO₂ sobre o seu crescimento e tolerância ao herbicida imazethapyr. Os experimentos realizados constaram da avaliação do efeito de inibidores e indutores de enzimas detoxificadoras de herbicidas, identificação e expressão de genes responsáveis pela resistência e avaliação do efeito de cenários de mudança climática sobre a biologia e controle de capim-arroz. A aspersão prévia dos inibidores enzimáticos malathion e butóxido de piperonila reverteu parcialmente a resistência a imazethapyr nas populações resistentes, diminuindo o fator de resistência (FR) de 15,92 para 3,44 e 4,94, respectivamente. De maneira oposta, a aspersão prévia de anidrido naftálico aumentou o FR dessas populações. A expressão relativa do gene *CYP81A6* foi aproximadamente 5 vezes superior na população resistente PALMS01, aumentando para cerca de 8,5 vezes em plantas tratadas com imazethapyr. A expressão relativa do gene *GSTF1* foi 12,3 vezes superior na população resistente em comparação com a suscetível. Além da maior expressão desses genes, foi observada a maior expressão relativa do gene *eIF4B*, o qual codifica para um fator iniciador de tradução. O aumento da temperatura influenciou de maneira mais acentuada a tolerância de plantas de capim-arroz ao herbicida imazethapyr em comparação com o aumento da concentração de CO₂. Com o aumento da temperatura de 24/20°C para 30/26°C, o FR em plantas cultivadas sob 400 ppm aumentou 72% e 55% para as populações ARRGR01 e PALMS01, respectivamente. Quando cultivadas em 700 ppm, o aumento do FR foi de 43% (ARRGR01) e 46,5% (PALMS01) em resposta ao aumento da temperatura. O teor relativo de clorofila foi inferior em condições de temperatura elevada. A taxa de transporte de elétrons foi severamente reduzida pelo aumento da concentração de CO₂ em plantas cultivadas em temperatura de 24/20°C. O incremento de metabolização causado pelo aumento da expressão de múltiplos genes está envolvido no processo de resistência ao imazethapyr em capim-arroz. Os aumentos da temperatura e da concentração de CO₂ aumentam o nível de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (149f.) Março, 2016.

GENE EXPRESSION ASSOCIATED TO DEGRADATION OF IMAZETHAPYR AND THE EFFECT OF TEMPERATURE AND CO₂ CONCENTRATION IN BARNYARDGRASS¹

Author: Giliardi Dalazen
Adviser: Aldo Merotto Jr.

ABSTRACT

Herbicide resistance and climate change are factors that affect the dynamics of weed populations in agricultural environments. A better understanding of these factors is essential for designing appropriate weed management strategies. The aim of this study was to identify the mechanism of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imazethapyr and to evaluate the effect of temperature and CO₂ concentration on growth and tolerance to the herbicide imazethapyr. Several experiments were carried out to evaluate the effect of inhibitors and inducers of herbicide detoxifying enzymes, the expression of genes potentially associated with herbicide detoxification, and the effect of climate change scenarios on the biology and control of barnyardgrass. The preliminary spraying of the enzyme inhibitors malathion and piperonyl butoxide partially reversed the resistance to imazethapyr on resistant populations, decreasing the resistance factor (RF) of 15.92 to 3.44 and 4.94, respectively. Conversely, the prior spraying of naphthalic anhydride increased the FR of these populations. The relative expression of *CYP81A6* gene was approximately 5 times higher in PALMS01 resistant population, rising to about 8.5 times in plants treated with imazethapyr, in comparison with the susceptible population. The relative expression of the gene *GSTF1* was 12.3 times higher in comparison with the population susceptible. The translation initiating factor *eIF4B* was also more expressed in the resistant populations. The increase in temperature affected more sharply the tolerance of barnyardgrass plants to imazethapyr as compared to the concentration of CO₂. The increase of temperature from 24/20°C to 30/26°C in plants grown under 400 ppm increased the RF in 72% and 55% for ARRGR01 and PALMS01 populations, respectively. In plants growing at 700 ppm this increasing of temperatures increased the RF in 43% (ARRGR01) and 46.5% (PALMS01). The relative chlorophyll content was lower than in high temperature conditions. The electron transport rate was severely reduced by increasing the concentration of CO₂ in plants grown in the temperature 24/20°C. The degradation enhancement caused by the high expression of multiples genes is involved in the resistance to the herbicide imazethapyr in barnyardgrass. The increasing of temperature and of the CO₂ concentration increase the resistance of barnyardgrass to the herbicide imazethapyr.

¹ Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (149p.) March, 2016.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
2. CAPÍTULO 1. OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DA RESISTÊNCIA A HERBICIDAS CAUSADA POR INCREMENTO DE METABOLIZAÇÃO PARA O MANEJO DE PLANTAS DANINHAS	8
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
2.1 INTRODUÇÃO	10
2.2 FASES DA METABOLIZAÇÃO.....	11
2.3 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE METABOLIZAÇÃO DE HERBICIDAS	13
2.3.1 Citocromo P450 monooxigenases - fase I da metabolização.....	13
2.3.2 Aryl acylamidases - fase I da metabolização	14
2.3.3 Glutathionas S-transferases (GSTs) - fase II da metabolização	14
2.3.4 Glicosiltransferases (GTs) - fase II da metabolização	15
2.3.5 Transportadores ABC - fase III da metabolização.....	16
2.4 DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA POR INCREMENTO DE METABOLIZAÇÃO E FATORES RELACIONADOS.....	17
2.4.1 Inibidores enzimáticos	17
2.4.2 Expressão diferencial de genes e regulação epigenética	18
2.4.3 Atividade de enzimas detoxificadoras	20
2.4.4 Análise de concentração de herbicidas e seus metabólitos.....	21
2.5 IMPORTÂNCIA DA METABOLIZAÇÃO NO MANEJO DA RESISTÊNCIA	22
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

3	CAPÍTULO 2- EFEITO DE INIBIDORES E INDUTORES DE ENZIMAS P450 SOBRE PLANTAS DE CAPIM-ARROZ TRATADAS COM IMAZETHAPYR.....	31
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT.....	32
3.1	INTRODUÇÃO	33
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
	3.2.1 Experimento 1- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450.....	35
	3.2.2 Experimento 2- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico.....	36
	3.2.3 Experimento 3- Quantificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz em resposta à aspersão prévia de malathion e anidrido naftálico.....	37
	3.2.4 Experimento 4- Mistura simultânea de imazethapyr com diferentes doses de malathion no controle de capim-arroz resistente a imidazolinonas	39
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
	3.3.1 Experimento 1- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450.....	40
	3.3.2 Experimento 2- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico.....	49
	3.3.3 Experimento 3- Quantificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz em resposta à aspersão prévia de malathion e anidrido naftálico.....	55
	3.3.4 Experimento 4- Mistura simultânea de imazethapyr com diferentes doses de malathion no controle de capim-arroz resistente a imidazolinonas	57
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
4	CAPÍTULO 3- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DETOXIFICAÇÃO DE IMAZETHAPYR EM PLANTAS DE CAPIM-ARROZ.....	63
	RESUMO.....	63
	ABSTRACT.....	64
4.1	INTRODUÇÃO	65
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	67
	4.2.1 <i>Produção do material vegetal</i>	67
	4.2.2 <i>Aspersão do herbicida</i>	68
	4.2.3 <i>Coleta das amostras</i>	68
	4.2.4 <i>Extração do RNA</i>	69

	Página
4.2.5	<i>Purificação do RNA e Síntese do cDNA</i> 70
4.2.6	<i>Genes candidatos e desenho dos primers</i> 71
4.2.7	<i>Análise em qRT-PCR</i> 72
4.2.8	<i>Análise da estabilidade dos genes referência</i> 73
4.2.9	<i>Análise da expressão gênica</i> 73
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 74
4.3.1	<i>Especificidade dos primers dos genes reguladores</i> 74
4.3.2	<i>Nível de expressão dos genes referência</i> 76
4.3.3	<i>Análise de estabilidade de genes referência</i> 76
4.3.4	<i>Análise de expressão do gene ALS</i> 80
4.3.5	<i>Análise de expressão dos genes CYP e GST</i> 81
4.3.6	<i>Análise de expressão do gene eIF4B</i> 84
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS 86
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87
5	CAPÍTULO 4- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ E DA TEMPERATURA SOBRE O CONTROLE, CRESCIMENTO E PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS DE CAPIM-ARROZ..... 91
	RESUMO..... 91
	ABSTRACT..... 92
5.1	INTRODUÇÃO 93
5.2	MATERIAL E MÉTODOS 95
5.2.1	Experimento 1- Efeito da concentração de CO ₂ e da temperatura sobre controle de capim-arroz tratadas com imazethapyr 96
5.2.2	Experimento 2- Efeito da concentração de CO ₂ e da temperatura sobre o crescimento e parâmetros fisiológicos em plantas de capim-arroz 97
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 98
5.3.1	Experimento 1- Efeito da concentração de CO ₂ e da temperatura sobre controle de capim-arroz tratadas com imazethapyr 98
5.3.2	Experimento 2- Efeito da concentração de CO ₂ e da temperatura sobre o crescimento e parâmetros fisiológicos em plantas de capim-arroz 107
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS 117
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118
6	CONCLUSÕES GERAIS..... 123
7	ANEXOS 125

	Página
8 VITA.....	131

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
1. Tratamentos avaliados na quantificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) em resposta à aspersão prévia de malathion (inibidor de P450) e anidrido naftálico (indutor de P450). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	38
2. Parâmetros da equação logística e C_{50} para a variável controle de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	46
3. Fator de resistência de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO) para as variáveis controle aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	47
4. Parâmetros da equação logística e GR_{50} para a variável massa de material seca da parte aérea (MMSPA) de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	48
5. Parâmetros da equação logística e C_{50} para as variáveis controle de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia anidrido naftálico (AN), aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	54
6. Parâmetros da equação logística e GR_{50} para a variável massa de material seca da parte aérea (MMSPA) de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico (AN). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	55
7. Fator de resistência de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico (AN) para as variáveis controle aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea	

(MMSPA), tendo como população suscetível a SUSSP01. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	55
---	----

CAPÍTULO 3

1. Relação dos genes referência e sequencias dos <i>primers</i> dos sete genes referência utilizados para a análise de RT-PCR em tempo real, tamanho do fragmento esperado e temperatura de pareamento. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	71
2. Relação dos genes <i>CYP</i> e <i>GST</i> e sequencias dos <i>primers</i> utilizados para a análise de RT-PCR em tempo real, tamanho do fragmento esperado e temperatura de pareamento. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	72
3. Classificação da estabilidade de sete genes referência em folhas de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas com imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	79

CAPÍTULO 4

1. Parâmetros da equação logística e C_{50} para a variável controle de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO_2 (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 7 e 14 dias após a aspersão do herbicida. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	103
2. Parâmetros da equação e GR_{50} para a variável massa de material seca da parte aérea (MMSPA) de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr em resposta à concentração de CO_2 (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 14 dias após a aspersão do herbicida. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	106
3. Fator de resistência de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr em resposta à concentração de CO_2 (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), para as variáveis controle aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	107

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

1. Representação da atividade de enzimas na detoxificação de herbicidas em plantas. A detoxificação é composta por quatro fases: a atividade monooxigenase por enzimas citocromo P450 monooxigenases (fase I), a reação de conjugação açúcares ou glutatona (GSH) por enzimas glicosiltransferases (GTs) ou glutatona S-transferases (GSTs), respectivamente (fase II), o transporte via transportadores ABC, seguido da compartimentalização no vacúolo (fase III) e incorporação na parede celular (fase IV). Modificado de Yu & Powles, 2014. 12

CAPÍTULO 2

1. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 41
2. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 42
3. Efeito visual da aplicação de imazethapyr (a) e de inibidores de enzimas P450, malathion (b) e PBO (c) sobre plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes ao herbicida imazethapyr (PALSM01), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos. Os inibidores foram aplicados duas horas antes da aplicação do herbicida imazethapyr, ambos na dose de 1000 g ha⁻¹. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 43
4. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas

populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	44
5. Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	45
6. Controle (%) de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos, em populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	50
7. Controle (%) de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	51
8. Controle (%) de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	52
9. Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.	53
10. Efeito da aplicação prévia de malathion e anidrido naftálico sobre a concentração de imazethapyr (mg kg ⁻¹ de tecido) em folhas de capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>). S: suscetível (SUSSP01); R: resistente (PALMS01); imi: imazethapyr (106 g ha ⁻¹); mal: malathion (1000 g ha ⁻¹ , duas horas antes da aplicação de imazethapyr); an: anidrido naftálico (1000 g ha ⁻¹ , duas horas antes da aplicação de imazethapyr); Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.....	56

11. Controle (%) aos 7 (a) e 14 (b) dias após a aplicação dos tratamentos e massa de material seca da parte aérea (MMSPA) (c) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr (106 g ha⁻¹) em associação com diferentes doses de malathion. Foram avaliadas duas populações resistentes (ARRGR01 e PALMS01) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 58

CAPÍTULO 3

1. Curvas de dissociação de sete genes referência em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis e resistentes às imidazolinonas, em resposta ao estresse pela aspersão de imazethapyr (barras verticais indicam o desvio padrão no Ct de cada gene). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 75
2. Valores de Ct de sete genes referência em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis e resistentes às imidazolinonas, em resposta ao estresse pela aspersão de imazethapyr (barras verticais indicam o desvio padrão no Ct de cada gene). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 76
3. Coeficientes de estabilidade de sete genes referência candidatos em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas com imazethapyr, utilizando os programas computacionais Delta Ct (A), BestKeeper (B), NormFinder (C) e geNorm (D). Quanto menor o valor do coeficiente, maior a estabilidade do gene. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 78
4. Classificação abrangente e coeficientes de estabilidade de sete genes referência candidatos em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas com imazethapyr. Quanto menor o valor do coeficiente, maior a estabilidade do gene. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016..... 80
5. Expressão relativa do gene *ALS* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01 e PALMS01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 81
6. Expressão relativa do gene *CYP81A6* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01 e PALMS01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 82

7. Expressão relativa do gene *GSTF1* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01 (A) e PALMS01 (B)) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 84
8. Expressão relativa do gene *eIF4B* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 85
9. Expressão dos genes *CYP81A6* (A), *GSTF1* (B) e *eIF4B* (C) em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 86

CAPÍTULO 4

1. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 99
2. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 101
3. Massa de matéria seca da parte aérea de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 105
4. Teor relativo de clorofila (TRC) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRG01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à

- concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 108
5. Taxa de transporte de elétrons (ETR) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRG01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 110
6. Número de perfilhos por planta (NPP) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRG01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 112
7. Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa de matéria seca de raiz (MMSR) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRG01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 113
8. Relação parte aérea/raiz (PA/R) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRG01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 115
9. Efeito da temperatura (24/20°C e 30/26°C) e concentração de CO₂ (400 e 700 ppm) sobre o crescimento de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (A) e MOSTS01 (B)) e resistentes (ARRG01 (C) e PALMS01 (D)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016. 116

1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são consideradas o principal limitante para a produção agrícola quanto ao aspecto fitossanitário (Oerke, 2006; Vila-Aiub *et al.*, 2009). O efeito das plantas daninhas sobre as culturas ocorre principalmente devido à competição por recursos essenciais para o crescimento e desenvolvimento, tais como água, luz, nutrientes e gás carbônico (Dias *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, o método mais comumente utilizado para o controle dessas plantas tem sido o controle químico (Busi *et al.*, 2011), substituindo homens, animais e implementos agrícolas (Powles & Yu, 2010). Entre as principais vantagens deste método estão a rápida operacionalidade, o não revolvimento do solo, o controle de plantas daninhas desde a implantação da cultura e a elevada eficiência (Vargas & Roman, 2006). No entanto, populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas pertencentes a vários mecanismos de ação vêm sendo selecionadas em todos os continentes, diminuindo a eficiência desses compostos (Heap, 2016).

Entre as plantas daninhas que apresentam resistência a herbicidas está o capim-arroz. Esta espécie é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz irrigado no sul do Brasil (Agostinetto *et al.*, 2010), podendo causar perdas de até 90% na produtividade do arroz, dependendo da densidade da infestante, cultivar e manejo da irrigação da lavoura (Pinto *et al.*, 2008). Mais de 80% das plantas daninhas que ocorrem na lavoura orizícola no estado do Rio Grande do Sul pertencem ao gênero *Echinochloa*

(Kissmann, 1999). No Brasil, entre as espécies de *Echinochloa* existentes, a de maior importância econômica e distribuição é *Echinochloa crus-galli* (Beltran *et al.*, 2012).

No Brasil, existem casos confirmados de resistência a herbicidas em duas espécies de capim-arroz: a resistência múltipla de *Echinochloa crus-galli* aos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) e ao quinclorac, e a resistência de *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* ao quinclorac (Heap, 2016). Na região sul do Brasil, o incremento de detoxificação por enzimas citocromo P450 monooxigenase (P450) está envolvido no processo de resistência em algumas populações (Matzenbacher *et al.*, 2015). Da mesma forma, biótipos resistentes de *E. crus-galli* da região sul dos Estados Unidos demonstraram como mecanismo parcial de resistência a herbicidas inibidores da enzima ALS a detoxificação por P450 (Riar *et al.*, 2012). Na China, biótipos de *E. crus-galli*, resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) apresentaram maior atividade da enzima glutationa S-transferase (GST), ao serem comparados com biótipos de populações suscetíveis (Huan *et al.*, 2011).

A resistência por incremento de detoxificação por enzimas P450 e GST é particularmente preocupante, já que a resistência em uma mesma espécie de planta daninha pode ocorrer para herbicidas de vários mecanismos de ação (resistência múltipla), inclusive para novos herbicidas (Powles & Yu, 2010). Na maioria dos trabalhos que visam elucidar o mecanismo de resistência, a sua detecção é realizada indiretamente por meio da utilização de inibidores enzimáticos (Yasour *et al.*, 2009). Contudo, métodos mais modernos têm sido empregados, de maneira a identificar os genes responsáveis pela detoxificação dos herbicidas em populações resistentes. Em *Echinochloa phyllopogon*, espécie pertencente ao mesmo gênero que o capim-arroz, alguns genes *CYP* já foram identificados como causa da resistência a herbicidas. Os genes *CYP81A12* e *CYP81A21* estão envolvidos na resistência aos herbicidas

bensulfuron-methyl e penoxsulan (Iwakami *et al.*, 2014a). Já os genes *CYP71AK2* e *CYP72A254* foram relatados como responsáveis pela resistência ao herbicida bispyribac-sodium (Iwakami *et al.*, 2014b). Em *E. crus-galli* são raros os registros de genes relacionados à resistência. O gene que codifica para uma enzima GST, *EcGST1*, foi descrito como responsável pela detoxificação de quinclorac em uma população resistente na China (Li *et al.*, 2013).

Os aumentos da temperatura e da concentração de CO₂ são considerados os principais fatores que promovem a atual mudança climática em nosso planeta (Solomon, 2007). Juntamente com variações da magnitude desses dois fatores, tem se encontrado alterações em sistemas agrícolas, incluindo as plantas daninhas (Ziska, 2000; Clements & Ditommaso, 2011). Vários experimentos que avaliam a competição de plantas daninhas têm sido desenvolvidos a fim de caracterizar os efeitos de elevadas temperaturas e concentrações de CO₂ sobre a fisiologia e o crescimento das espécies vegetais (Ziska & McConnells, 2016). Do ponto de vista adaptativo e de dispersão das espécies, observa-se o aumento no impacto das plantas daninhas com o cenário de mudança climática (Thuiller *et al.*, 2006; McDonald *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Em capim-arroz, o maior acúmulo de biomassa e antecipação do ciclo das plantas foi observado sob temperaturas elevadas (Peters & Gerowitt, 2014).

Além das alterações no crescimento e biologia geradas nas plantas daninhas pela mudança climática, o controle dessas espécies por meio da utilização de herbicidas também pode ser alterado. Alguns estudos indicam o efeito neutro ou aumento da tolerância de plantas daninhas aos herbicidas com o aumento da temperatura e concentração de CO₂, principalmente para o herbicida glyphosate (Ziska *et al.*, 1999; Ziska *et al.*, 2004; Manea *et al.*, 2011; Downey *et al.*, 2012). No entanto, não há descritos os efeitos da interação da temperatura com a concentração de CO₂ sobre o

crescimento e resposta aos herbicidas em capim-arroz, principalmente em populações resistentes e cujo mecanismo de resistência esteja relacionado ao incremento de metabolização.

Objetivos gerais

Identificar o mecanismo de resistência de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) ao herbicida imazethapyr e avaliar o efeito da temperatura e da concentração de CO₂ sobre o seu crescimento e tolerância ao herbicida.

Objetivos específicos

- i. Avaliar o efeito de inibidores e indutores de enzimas P450 sobre o controle de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr.
- ii. Determinar genes referência para estudos de análise de expressão gênica em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) submetidas a estresse pelo herbicida imazethapyr.
- iii. Identificar e analisar a expressão de genes relacionados ao incremento de metabolização de imazethapyr em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*).
- iv. Avaliar o efeito da temperatura e da concentração de CO₂ sobre o controle de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr.
- v. Avaliar o efeito da temperatura e da concentração de CO₂ sobre o crescimento e parâmetros fotossintéticos de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*).

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D. et al. Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. especial, p. 993-1003, 2010.

BELTRAN, J. C. et al. A bioeconomic model for analysis of integrated weed management strategies for annual barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* complex) in Philippine rice farming systems. **Agricultural Systems**, Essex, v. 112, n.1, p. 1-10, 2012.

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

CLEMENTS, D. R.; DITOMMASO, A. Climate change and weed adaptation: can evolution of invasive plants lead to greater range expansion than forecasted? **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 227-240, 2011.

DIAS, A. C. R. et al. Competitiveness of alexandergrass or Bengal dayflower with soybean. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 515-522, 2010.

DOWNEY, P. O. et al. Does the tolerance of weeds to herbicide change with elevated levels of CO₂? In: AUSTRALASIAN WEEDS CONFERENCE, 18., Melbourne, Victoria, Australia, 2012. [**Proceedings**]. Melbourne, Victoria, Australia, 2012.

HEAP, I. **The International survey of herbicide resistant weeds**. 2016. Disponível em: <www.weedscience.com>. Acesso em: 03 mar. 2016.

HUAN, Z. et al. Resistance level and metabolism of barnyard-grass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) populations to quizalofop-p-ethyl in heilongjiang province, China. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 10, n. 12, p. 1914-1922, 2011.

IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014a.

IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, London, v. 70, n. 4, p. 549-558, 2014b.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2^a ed. São Bernardo do Campo: Basf, 1999. t.2, 978 p.

LI, G. et al. Identification and expression pattern of a glutathione S-transferase in *Echinochloa crus-galli*. **Weed Research**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 314-321, 2013.

MANEA, A. et al. Exotic C4 grasses have increased tolerance to glyphosate under elevated carbon dioxide. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 1, p. 28-36, 2011.

MATZENBACHER, F. de O. et al. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015.

MCDONALD, A. et al. Climate change and the geography of weed damage: Analysis of U.S. maize systems suggests the potential for significant range transformations **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 131-140, 2009.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

PETERS, K.; GEROWITT, B. Important maize weeds profit in growth and reproduction from climate change conditions represented by higher temperatures and reduced humidity. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 87, n. 1, p. 234-242, 2014.

PINTO, J. J. O. et al. Controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 767-777, 2008.

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

RIAR, D. S. et al. Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **International Journal of Agronomy**, [S.l.], v. 2012, ID 893953, 8 pg., 2012.

SOLOMON, S. et al. **Climate change 2007: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 996 p.

THUILLER, W. et al. Interactions between environment, species traits, and human uses describe patterns of plant invasions. **Ecology**, New York, v. 87, n. 7, p. 1755-1769, 2006.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Manejo de controle de plantas daninhas na cultura de soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. (Documentos, n. 62)

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

WANG, R. L. et al. Elevated temperature may accelerate invasive expansion of the liana plant *Ipomoea cairica*. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 574-580, 2011.

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

ZISKA, L. H. et al. Changes in biomass and root:shoot ratio of field-grown Canada thistle (*Cirsium arvense*), a noxious, invasive weed, with elevated CO₂: implications for control with glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 4, p. 584-588, 2004.

ZISKA, L. H. et al. Future atmospheric carbon dioxide concentrations may increase tolerance to glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 47, n. 5, p. 608-615, 1999.

ZISKA, L. H.; McCONNELLS, L. L. Climate change, carbon dioxide, and pest biology: monitor, mitigate, manage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 64, n. 1, p. 6-12, 2016.

ZISKA, L. The impact of elevated CO₂ on yield loss from a C₃ and C₄ weed in field-grown soybean. **Global Change Biology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 899-905, 2000.

2 CAPÍTULO 1. OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DA RESISTÊNCIA A HERBICIDAS CAUSADA POR INCREMENTO DE METABOLIZAÇÃO PARA O MANEJO DE PLANTAS DANINHAS

- Revisão de literatura submetida à Revista Brasileira de Herbicidas -

RESUMO

A resistência a herbicidas causada por mecanismos não relacionados ao local de ação (NRLA), principalmente incremento de metabolização, é muito problemática devido à ocorrência de biótipos com resistência múltipla, e é um novo desafio para o manejo de plantas daninhas e utilização de herbicidas. Recentemente, enzimas associadas à degradação de xenobióticos, especialmente citocromo P450, GSTs e transportadores ABC, têm sido associadas à resistência a herbicidas em várias plantas daninhas. Os objetivos desta revisão são descrever o conhecimento atual da regulação gênica associada à resistência a herbicidas causada pelo incremento de metabolização e analisar as principais implicações deste problema para definir estratégias adequadas de manejo com o uso de herbicidas. A resistência múltipla a herbicidas causada pelo incremento da degradação ocorre em *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides*, *Echinochloa phyllopogon* e outras várias espécies. O nível de resistência a herbicidas causada pelo incremento de metabolização é afetado por fatores ambientais em vários casos, o que dificulta o diagnóstico da resistência e facilita sua distribuição. O manejo moderno de plantas daninhas deve considerar as características de degradação do herbicida, uma vez que a simples rotação de herbicidas pode não ser suficiente para prevenir a ocorrência da resistência a estes produtos. A utilização de misturas sinérgicas de herbicidas e outros inibidores enzimáticos pode contribuir para prevenir e controlar a resistência NRLA.

CHAPTER 1- OCCURRENCE AND IMPORTANCE OF RESISTANCE TO HERBICIDES CAUSED BY INCREASE OF METABOLISM FOR WEED MANAGEMENT

- Literature Review submitted to the Revista Brasileira de Herbicidas -

ABSTRACT

Non-target-site (NTS) herbicide resistance, mainly caused by degradation enhancement, is very problematic due to the occurrence of biotypes with multiple resistance and is a new challenge for weed management and herbicide use. Recently, enzymes associated with xenobiotic degradation especially cytochrome P450, GSTs and ABC transporters, have been associated with the herbicide resistance in several weeds. This knowledge opens a new window to understand the evolution of NTS. The aims of this review are to describe the gene regulations associated with the herbicide resistance caused by degradation enhancement and to analyze the main interactions of this problem in order to design the adequate management strategies for herbicide use. Multiple herbicide resistance caused by degradation enhancement occurs in *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides*, *Echinochloa phyllopogon* and in several other species. The level of herbicide resistance caused by degradation enhancement is affected by environmental factors in several cases, which difficult the resistance diagnostic and facilitate its distribution. The modern weed management should consider the characteristics of the herbicide degradation, since the simple rotation of herbicides may not be enough to prevent the herbicide resistance. The use of synergistic mixtures of herbicides and other enzyme inhibitors can contribute to the prevention and control of NTS resistance.

2.1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas são resultantes da ocorrência de mutações que causam diminuição da sensibilidade das plantas a estes compostos. Existem dois mecanismos primários de resistência: a resistência relacionada ao local de ação do herbicida (RLA) e a resistência não relacionadas ao local de ação do herbicida (NRLA) (Yuan *et al.*, 2007; Yu & Powles, 2014). A resistência RLA ocorre quando doses letais do herbicida alcançam o local de ação, mas, devido à ocorrência de mutação que confere substituição de aminoácidos no gene que codifica a enzima alvo, ocorrem mudanças na conformação da enzima, prevenindo a ligação do herbicida ao local de ação (Powles & Yu, 2010). Além da redução da sensibilidade enzimática em relação ao herbicida, a RLA pode ser conferida pelo aumento da expressão do gene alvo, que pode ocorrer tanto devido à amplificação do gene quanto por mutações na região promotora (Gaines *et al.*, 2010; Powles & Yu, 2010). A resistência NRLA deve-se a ocorrência de mecanismos que limitam a chegada de dose letal do herbicida ao local de ação. Estes mecanismos incluem, principalmente, a menor absorção do herbicida pela planta, alteração na translocação e incremento da metabolização do herbicida (Powles & Yu, 2010).

O incremento de metabolização é responsável pela detoxificação do herbicida pelas plantas que, por meio da atividade de enzimas detoxificadoras transformam o herbicida em compostos menos tóxicos que a molécula parental. Assim como a metabolização é responsável pela resistência de plantas daninhas, esse mecanismo de detoxificação é o principal mecanismo de seletividade de herbicidas sobre culturas (Devine *et al.*, 1993). As principais enzimas envolvidas nesse processo são a citocromo P450 monooxigenase (P450) e glutathione S-transferase (GST) (Powles & Yu, 2010). Este tipo de resistência está envolvido em fenômenos de resistência múltipla, em que

plantas são resistentes a herbicidas de diversas famílias químicas, pertencentes a diferentes mecanismos de ação (Buono & Ioli, 2011). Isto torna ainda mais complexo e importante o seu entendimento, devido à diminuição das opções de herbicidas para o manejo de populações com resistência múltipla.

Os objetivos desta revisão são descrever o atual conhecimento da regulação gênica associada à resistência a herbicidas causada pelo incremento de metabolização e analisar as principais implicações deste problema para definir estratégias adequadas de manejo com o uso de herbicidas.

2.2 FASES DA METABOLIZAÇÃO

A detoxificação de herbicidas em plantas é dividida em quatro fases (Yuan *et al.*, 2007): fase I- conversão; fase II- conjugação; fase III- conversão secundária e transporte para o vacúolo e; fase IV- deposição do metabólito final (figura 1). Durante a fase I, a molécula do herbicida sofre modificações químicas, tais como oxidação, redução, hidrólise, oxigenação ou hidroxilação. Nesse processo, atuam principalmente enzimas P450, que catalisam reações de oxidação e redução de substratos endógenos e xenobióticos (Yuan *et al.*, 2007). Nesta fase também pode atuar a enzima aryl acylamidase, a qual é responsável pela hidrólise da molécula de herbicida (Powles & Shaner, 2001). Na fase II, a molécula do herbicida ou o metabólito resultante da fase I é conjugado com substratos hidrofóbicos ou eletrofílicos (açúcares, aminoácidos ou glutationas) por enzimas da família GST ou por glicosiltransferases (GTs) (Yuan *et al.*, 2007; Reade *et al.*, 2004). Isso faz com que ocorra o aumento da solubilidade em água e diminua a fitotoxicidade do herbicida (Carvalho *et al.*, 2009). Na fase III, os metabólitos resultantes da fase II são transportados para o vacúolo por transportadores ABC (ATP-

binding cassette) (Yuan *et al.*, 2007). Durante essa fase podem ocorrer conjugações secundárias, originando compostos não-fitotóxicos (Hatzios, 1991). Por fim, na fase IV, os metabólicos derivados do processo de detoxificação, compartimentalizados nos vacúolos, podem ser associados com componentes da parede celular, tais como pectina, lignina, polissacarídeos e frações proteicas, formando resíduos insolúveis (Skidmore, 2000).

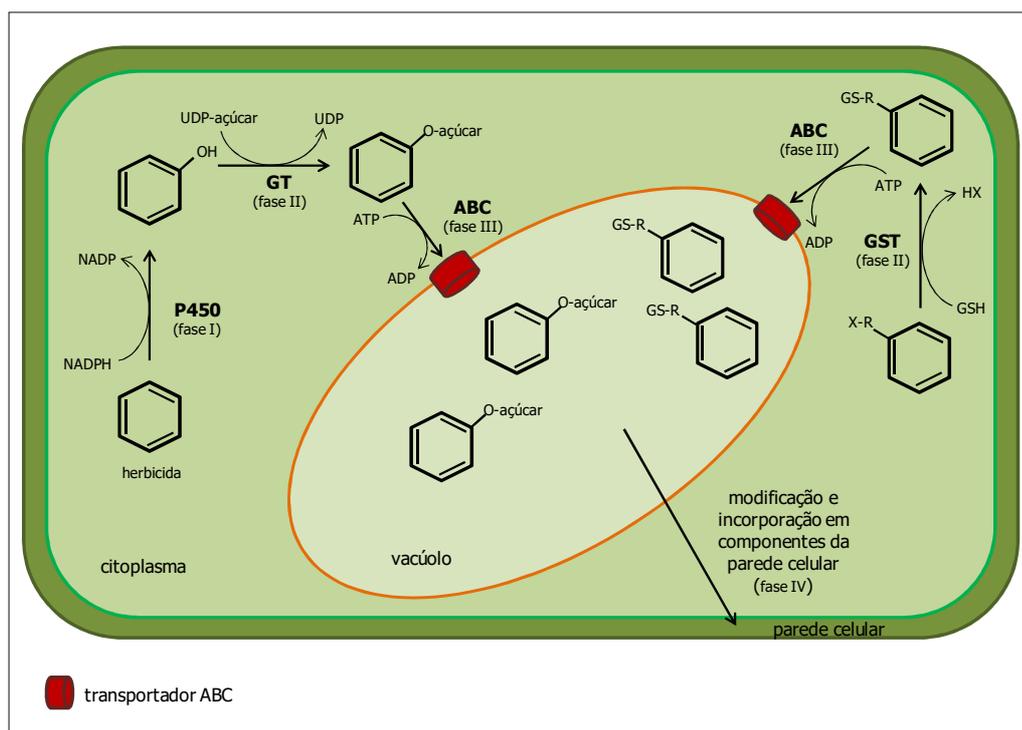


FIGURA 1. Representação da atividade de enzimas na detoxificação de herbicidas em plantas. A detoxificação é composta por quatro fases: a atividade monooxigenase por enzimas citocromo P450 monooxigenases (fase I), a reação de conjugação açúcares ou glutatona (GSH) por enzimas glicosiltransferases (GTs) ou glutatona S-transferases (GSTs), respectivamente (fase II), o transporte via transportadores ABC, seguido da compartimentalização no vacúolo (fase III) e incorporação na parede celular (fase IV). Modificado de Yu & Powles, 2014.

2.3 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE METABOLIZAÇÃO DE HERBICIDAS

2.3.1 Citocromo P450 monooxigenases - fase I da metabolização

A família de genes citocromo P450 (*CYP*) está entre as mais abundantes em plantas (Nelson & Werck-Reichhart, 2011). As enzimas P450 são conhecidas como enzimas-chave na fase I do metabolismo de xenobióticos, e possuem papel fundamental da detoxificação de herbicidas em plantas (Yun *et al.*, 2005). São heme-proteínas que normalmente catalisam reações de monoxigenação dependentes de oxigênio e NADPH (Yuan *et al.*, 2007). Essas enzimas estão envolvidas na rápida evolução da resistência de biótipos de azevém (*Lolium rigidum*), principalmente devido ao uso de subdoses de herbicidas (Busi *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). Em *Echinochloa phyllopogon* foi verificada a maior expressão dos genes *CYP81A12* e *CYP81A21* em plantas resistentes aos herbicidas bensulfuron-methyl e penoxulam, ambos inibidores da enzima ALS (Iwakami *et al.*, 2014a). Na mesma espécie, os genes *CYP71AK2* e *CYP72A254* apresentaram maior expressão em plantas resistentes ao herbicida bispyribac-sodium (Iwakami *et al.*, 2014b). Em *Echinichloa crus-galli*, o gene *CYP81A6* apresentou maior expressão em plantas resistentes ao herbicida imazethapyr (Dalazen *et al.*, 2015b).

Além de serem responsáveis pela resistência em plantas daninhas, genes *CYP* também estão relacionados aos mecanismos de tolerância a herbicidas em culturas, tais como *CYP72A21* e *CYP81A6* em *O. sativa* (Pan *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012), *CYP72A5* em *Zea mays* (Persans *et al.*, 2001), *CYP81B2* e *CYP71A11* em *Nicotiana tabaccum* (Yamada *et al.*, 2000), *CYP71C6v1* em *Triticum aestivum* (Xiang *et al.*, 2006) e *CYP71A10* em *Glycine max* (Siminszky *et al.*, 1999).

2.3.2 *Aryl acylamidases - fase I da metabolização*

As aryl acylamidases são enzimas que catalisam a hidrólise de certas acylamidas (Powles & Shaner, 2001). A detoxificação do herbicida inibidor do fotossistema II propanil pela ação dessas enzimas em arroz conduz a formação de 3,4-dichloroanilina (DCA) e ácido propiônico. Estudos realizados com biótipos de *Echinochloa* spp. resistentes ao propanil também denotaram a participação dessa enzima na detoxificação (Hoagland *et al.*, 2004). Em biótipo de *Leptochloa chinensis* resistente ao propanil foi identificada a presença de DCA após a aspersão do herbicida, além do aumento da atividade da enzima aryl acylamidase em relação ao biótipo susceptível (Ismail *et al.*, 2013).

2.3.3 *Glutathionas S-transferases (GSTs) - fase II da metabolização*

As glutathionas S-transferases (GSTs) são enzimas que atuam na fase II da detoxificação, catalisando a conjugação do grupo tiol da glutathiona (GSH) com centros eletrofílicos de moléculas lipofílicas para formar produtos menos ativos (Öztetik, 2008; Edwards *et al.*, 2011). Essas enzimas podem ser induzidas por estresses bióticos ou abióticos, tais como o estresse osmótico e temperaturas elevadas, além de estresses oxidativos ocasionados por herbicidas (Dixon *et al.*, 2002).

A detoxificação por conjugação com glutathiona (GSH) é observada principalmente em herbicidas pertencentes aos grupos das clorotriazinas, difenileters, cloroacetanilidas, sulfoniluréias e ariloxifenoxipropionatos (Cummins *et al.*, 2011), sobretudo em poáceas. Plantas de *E. crus-galli* resistentes ao quizalofop-p-ethyl apresentaram maior atividade de uma GST quando comparadas aos biótipos susceptíveis (Huan *et al.*, 2011). Em biótipos de *E. crus-galli* resistentes, após a aspersão do herbicida quinclorac foi observado aumento de 6-10 vezes no nível de

expressão de um gene que codifica uma glutathione S-transferase (*EcGST1*) (Li *et al.*, 2013). Alguns estudos indicam que a resistência de *Alopecurus myosuroides* a vários herbicidas é ocasionada por uma GST codificada pelo gene *AmGSTF1* (Cummins *et al.*, 2013). O gene *OsGSTL2* é responsável pela codificação de uma GST que está envolvida na detoxificação do herbicida chlorsulfuron em *O. sativa*. A superexpressão desse gene em plantas de arroz promoveu um aumento na tolerância aos herbicidas chlorsulfuron e glyphosate (Hu, 2014).

Apesar da participação de GSTs na detoxificação de herbicidas em poáceas, também existem informações da atividade destas enzimas em plantas de outras famílias botânicas. A detoxificação de atrazine em plantas de *Abutilon theophrasti* resistentes está relacionada à ação de GSTs (Gronwald & Plaisance, 1999). Plantas de *Sonchus oleraceus* resistentes a simazine quando expostas ao herbicida mostraram atividade de GST em torno de 8,3 vezes superior em relação ao material susceptível (Fraga & Tasende, 2003). As enzimas GSTs também estão envolvidas nos mecanismos de seletividade de herbicidas em culturas, tal como a detoxificação de cloroacetanilidas e difeniléteres na cultura da soja, realizada pelo gene *GmGSTU4* (Benekos *et al.*, 2010).

2.3.4 Glicosiltransferases (GTs) - fase II da metabolização

As glicosiltransferases (GTs) são enzimas que catalisam a formação da ligação glicosídica entre um açúcar e um aceptor, o qual pode ser uma gama de biomoléculas incluindo outros açúcares, proteínas, lipídios e moléculas pequenas (Gloster, 2014). As famílias de GTs de plantas são capazes de reconhecer hormônios e metabólitos secundários, bem como toxinas naturais e produtos químicos (Bowles & Lim, 2010).

A ação de GTs na conjugação direta de herbicidas em plantas foi observada em 2,4-D, clopyralid, chloramben, diclofop-methyl, hidrazida maleica, MCPA, met amitron,

metribuzin, picloram e quinclorac. Todavia, a conjugação dos herbicidas 2,4-D, acifluorfen, bentazon, dicamba, diclofop-methyl, flamprop-methyl, fluorodifen, sulfoniluréias e propanil, em algumas espécies de plantas, somente foi possível após a ativação por enzimas P450 (Schröder & Collins, 2002). Em alguns casos, a conjugação direta de determinados herbicidas (ex. 2,4-D e diclofop-methyl), mediada por GTs, não resulta em detoxificação estável na planta. Isto ocorre devido à rápida conversão dos conjugados para a forma de herbicida ativo (Kreuz *et al.*, 1996).

De modo diferenciado ao observado nas enzimas P450 e GSTs, existem poucos estudos que demonstram a ação de GTs como mecanismo principal de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Trabalho realizado com *A. myosuroides* detectou maior atividade de GTs na população resistente em comparação a susceptível. Porém, a resistência dessa população também foi associada à ação de enzimas P450 e GSTs (Brazier-Hicks *et al.*, 2002).

2.3.5 Transportadores ABC (ATP-binding cassette) - fase III da metabolização

Os transportadores ABC correspondem a uma superfamília de transportadores ligados à membrana e proteínas solúveis que realizam o transporte de moléculas através da membrana celular num processo que envolve a hidrólise de ATP (Remy & Duque, 2014). Na maioria dos casos, o transporte envolve a remoção de substratos do citosol para compartimentos extracitosólicos, incluindo o espaço extracelular ou o vacúolo (Frelet-Barrand *et al.*, 2008).

Em plantas existem relatos da atuação de transportadores ABC na detoxificação de herbicidas, mais especificamente no transporte de conjugados S-glutationilados. A indução da expressão *ZmMRP1* foi observada em plantas de milho após a aplicação dos herbicidas seletivos 2,4-D, atrazine, metolachlor e primisulfuron (Pang *et al.*, 2012). Em

Arabidopsis thaliana, a superexpressão do gene *AtPgp1* aumentou a resistência aos herbicidas dicamba, pendimetalina, oryzalin e MSMA (Windsor *et al.*, 2003). A perda de função do gene *AtPDR11* em plantas de *A. thaliana* conferiu maior tolerância a paraquat (Xi *et al.*, 2012). Recentemente, a resistência *Conyza canadensis* ao herbicida glyphosate foi associada à sincronização da maior expressão de genes que codificam a enzima EPSPS e transportadores ABC (Tani *et al.*, 2015). Os genes *M10* e *M11* apresentaram expressão relativa superior (quatro vezes) em plantas tratadas com glyphosate, 24 horas após a aplicação do herbicida, com significativa redução na expressão desses genes após esse período.

2.4 DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA POR INCREMENTO DE METABOLIZAÇÃO E FATORES RELACIONADOS

2.4.1 Inibidores enzimáticos

A detecção da ocorrência de metabolização de herbicidas por enzimas P450 pode ser realizada indiretamente, por meio do uso de inibidores enzimáticos (Yasour *et al.*, 2009, Matzenbacher *et al.*, 2015). Entre eles estão o 1-aminobenzotriazole (ABT), butóxido de piperonila (PBO) e malathion (Siminszky, 2006; Elmore *et al.*, 2015). O inseticida organofosforado malathion é o inibidor mais comumente utilizado e a inibição ocorre quando o átomo de enxofre liberado pelo organofosfato oxigenado inibe a ação da enzima P450 (Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Em *L. rigidum*, a utilização de malathion reverteu a resistência de biótipos resistentes a chlorsulfuron (Yu *et al.*, 2009). Da mesma forma, em *E. phyllopogon*, o uso do inibidor de P450 malathion aumentou a fitotoxicidade do herbicida penoxsulam em plantas resistentes devido à menor detoxificação do herbicida (Yasour *et al.*, 2009). Em biótipo de *E. crus-galli* resistente

ao herbicida imazethapyr, a resistência foi parcialmente revertida, tanto com a aplicação de malathion quanto de PBO, ambos aplicados na dose de 1000 g ha⁻¹, duas horas antes da aplicação do herbicida. A redução do fator de resistência com a aplicação de malathion e PBO foi reduzida de 15,94 para 3,44 e 4,94, respectivamente (Dalazen *et al.*, 2015a).

A inibição da enzima aryl acylamidase pode ser obtida por meio da aplicação prévia do inseticida carbaril. A reversão da resistência de *E. crus-galli* e *E. colona* ao herbicida propanil foi observada com a aplicação prévia (24 horas) de 1100 g ha⁻¹ de carbaril (Hoagland *et al.*, 2004).

No caso de enzimas GSTs, a detecção da resistência pode ser observada pelo uso de inibidores que atuam como mimetizadores de glutathione (GSH), que se ligam ao sítio de conjugação da enzima GST, inibindo a ligação com o herbicida ou metabólito oriundo da fase I da metabolização (Cummins *et al.*, 2013). O inibidor de GST 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl), aplicado 48 horas antes da aplicação dos herbicidas, na dose de 270 g ha⁻¹, melhorou a eficiência de fenoxaprop-p-ethyl e clodinafop-propargyl sobre plantas de *A. myosuroides* (Cummins *et al.*, 2013). Outro inibidor de GST é o tridiphane, o qual reverteu a resistência de *Lupinus angustifolius* a metribuzin, aplicado na dose de 50 g ha⁻¹, duas horas antes da aplicação do herbicida (Pan *et al.*, 2012).

2.4.2 Expressão diferencial de genes e regulação epigenética

Recentemente, métodos baseados em biologia molecular têm auxiliado na identificação dos mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas (Délye *et al.*, 2015). A avaliação da expressão diferencial de genes tem sido realizada por meio de reações de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*). A qPCR é uma ferramenta

analítica versátil, em que um fluoróforo é utilizado para reportar a quantidade de produto de PCR em tempo real, durante cada ciclo de PCR (Délye *et al.*, 2015). Essa técnica foi utilizada em plantas de *E. phyllopogon* na avaliação da expressão diferencial dos genes *CYP81A12* e *CYP81A21* (Iwakami *et al.*, 2014a) e *CYP71AK2* e *CYP72A254* (Iwakami *et al.*, 2014b), os quais apresentaram maior expressão relativa em biótipos resistentes. Em biótipos de *E. crus-galli*, reações de qPCR demonstraram a ocorrência de maior expressão do gene *EcGST1* (Li *et al.*, 2013) e *CYP81A6* (Dalazen *et al.*, 2015b) em plantas resistentes, assim como em *A. myosuroides* em relação ao gene *AmGSTF1* (Cummins *et al.*, 2013).

Além da ocorrência de mutações, a expressão de determinados genes pode ser explicada por fatores epigenéticos. Recentemente, alguns autores têm sugerido que a regulação epigenética possa estar envolvida na evolução da resistência de plantas daninhas aos herbicidas (Gressel, 2009; Délye, 2013). A hipótese do envolvimento da regulação epigenética na evolução da resistência é baseada no fato de que alguns herbicidas podem causar estresse oxidativo similar aos causados por estresses abióticos em plantas (Eldeen & Radwan, 2012). Muitas das enzimas envolvidas no processo de metabolização de herbicidas são enzimas envolvidas em rotas basais de resposta a estresses, como a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em condições de estresse (Tausz, 2001). Até o momento, são escassos os estudos que relacionam o efeito de herbicidas sobre a regulação epigenética, assim como as consequências sobre a expressão de genes relacionados à detoxificação de herbicidas.

Em estudo realizado com glyphosate em *T. aestivum*, diferentes doses do herbicida causaram alterações na metilação do DNA, com variações de 28,3 a 73,9% na metilação do DNA de plantas tratadas (Nardemir *et al.*, 2015). Estudos iniciais em *A. thaliana* têm demonstrado que os herbicidas imazethapyr, glyphosate e 2,4-D não

induziram alterações na metilação global do DNA dessa espécie (Markus, dados não publicados). No entanto, quando diferentes mutantes relacionados com vias epigenéticas específicas foram testados, observou-se maior suscetibilidade aos herbicidas em genótipos mutantes (Markus, dados não publicados). Desse modo, a regulação epigenética pode ser considerada um importante tópico para a agricultura e manejo de plantas daninhas, embora os estudos estejam em fase inicial.

2.4.3 Atividade de enzimas detoxificadoras

A resistência por incremento de metabolização pode estar relacionada à maior atividade de enzimas detoxificadoras (Yu & Powles, 2014). Isso significa que as enzimas sintetizadas em plantas resistentes apresentam maior atividade metabólica e, conseqüentemente, maior consumo de substrato (herbicida). Dessa forma, a avaliação da atividade de enzimas detoxificadoras, tais como a P450 e GSTs pode ser indicativo da resistência por incremento de metabolização (Yun *et al.*, 2005).

Em estudo realizado com *E. crus-galli*, os biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ACCase, apresentaram maior atividade da enzima GST, em comparação com biótipos de populações suscetíveis (Huan *et al.*, 2011). Em outro estudo, a atividade de enzimas P450 foi avaliada em biótipos resistentes e suscetíveis de *E. phyllopogon* (Yun *et al.*, 2005). Plantas resistentes apresentaram maior concentração de P450, assim como maior atividade, principalmente com a aplicação de herbicidas.

A atividade de enzimas detoxificadoras de herbicidas, assim como as demais enzimas, é dependente de fatores ambientais, principalmente a temperatura (Mahan *et al.*, 2004). Alguns estudos demonstram a relação entre a temperatura e o metabolismo de herbicidas devido à atividade de enzimas detoxificadoras. Em *Amaranthus palmeri*, tanto a velocidade de metabolização quanto a quantidade de mesotrione metabolizada

foram superiores sob temperaturas mais elevadas (40/30°C - dia/noite) em relação às plantas cultivadas em temperaturas mais amenas (25/15°C e 32,5/22,5°C) (Godar *et al.*, 2015). De modo semelhante, espécies gramíneas apresentaram, em média, 56% e 68% de metabolização de amicarbazone em temperaturas de 25/20°C e 40/35°C, respectivamente (Yu *et al.*, 2015). Embora a atividade enzimática não tenha sido mensurada em ambos os estudos, os autores atribuem a maior metabolização do herbicida sob altas temperaturas à maior atividade de enzimas detoxificadoras. Contudo, alguns estudos confirmam a maior atividade de enzimas detoxificadoras em altas temperaturas. Em plantas de *A. myosuroides*, a atividade de enzima GST foi superior em plantas cultivadas em temperatura mais elevada (25°C vs. 10°C), principalmente no biótipo resistente (Milner *et al.*, 2007).

2.4.4 *Análise de concentração de herbicidas e seus metabólitos*

A presença de quantidades variáveis do herbicida em tecidos de plantas tratadas, assim como a detecção de seus metabólitos, é um indicativo da ocorrência de metabolismo de herbicidas em plantas daninhas. O metabolismo de fenoxaprop e mesosulfuron+iodosulfuron em plantas com resistência múltipla foi avaliado em plantas de *A. myosuroides*, por meio de análise por LC/MS-MS (*Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry*) (Kaiser & Gerhards, 2015). Em plantas resistentes, a quantidade dos herbicidas analisados foi menor em comparação com as plantas suscetíveis.

Outra forma de analisar a ocorrência de metabolismo é por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Yu & Powles, 2014). Nesse tipo de estudo, a detecção do herbicida na forma parental e de seus metabólitos é realizada pela análise do perfil metabólico das moléculas radioativamente marcadas com [¹⁴C]. Em

plantas de *L. rigidum*, o perfil metabólico do herbicida [¹⁴C]chlorsulfuron demonstrou a maior presença do herbicida na forma parental em plantas suscetíveis, demonstrando não ocorrer a metabolização nesse biótipo. No entanto, no biótipo resistente, além da quantidade de herbicida detectada na forma parental ter sido menor, foi observada a maior presença de um metabólito oriundo do metabolismo de imazetaphyr (Christopher *et al.*, 1991). A mesma metodologia foi utilizada na análise de glifosato e seus metabólitos em plantas resistentes e suscetíveis de *Digitaria insularis* (Carvalho *et al.*, 2013) e *C. canadensis* (González-Torralva *et al.*, 2012). Em biótipos resistentes, a degradação do glifosato em metabólitos (ácido aminometilfosfônico, glioxilato e sarcosina) foi superior à observada no biótipo suscetível.

2.5 IMPORTÂNCIA DA METABOLIZAÇÃO NO MANEJO DA RESISTÊNCIA

A ocorrência de resistência cruzada e múltipla de plantas daninhas a herbicidas tem se tornado cada vez mais frequente, evidenciando a atuação de mecanismos de resistência complexos. O incremento de metabolização de herbicidas está envolvido em fenômenos de resistência múltipla, em que plantas são resistentes a herbicidas de diversas famílias químicas, pertencentes a diferentes mecanismos de ação (Buono & Ioli, 2011). A resistência a herbicidas em *L. rigidum* é o exemplo mais impactante da evolução da resistência. Nessa espécie, ocorrem concomitantemente mecanismos de resistência NRLA e RLA, tornando comum o acúmulo de mecanismos de resistência distintos em um mesmo indivíduo (Powles & Yu, 2010; Han *et al.*, 2014). Na Austrália, seis populações de *L. rigidum* são descritas por apresentarem resistências cruzadas ou múltiplas, em que está presente o incremento de metabolização de herbicidas inibidores

da ACCase, ALS, fotosistema II e dinitroanilidas (Yu & Powles, 2014). A população VLR69 de *L. rigidum* apresentou, após 21 anos de seleção por diferentes herbicidas, resistência a 11 grupos de herbicidas pertencentes a cinco mecanismos de ação (Heap, 2014).

O aumento do número de casos de resistência cruzada e múltipla devido ao incremento de metabolização de herbicidas deve ser cada vez mais reconhecido como uma grave ameaça para eficácia de herbicidas (Délye, 2013; Yu & Powles, 2014). Nesse contexto, estratégias de manejo da resistência baseado na rotação de mecanismos de ação podem não ser eficazes pelo fato de que a resistência por incremento de metabolização pode conferir resistência a vários grupos de herbicidas, incluindo herbicidas nunca utilizados. É fundamental priorizar a rotação e associação de herbicidas que não apresentem potencial de serem metabolizados pelos mecanismos até então conhecidos. Herbicidas que inibem as enzimas ALS ou ACCase são mais comumente metabolizáveis (Powles & Yu, 2010; Beckie & Tardif, 2012) e, portanto, devem ser utilizados de maneira racional no programa de rotação de herbicidas. Além disso, a adoção de manejo alternativo da resistência poderá ser possível a partir da utilização de agentes químicos sinérgicos junto aos herbicidas, com capacidade de inibir as enzimas responsáveis pela metabolização (Yu & Powles, 2014). O avanço do conhecimento destes processos poderá resultar na estratégia de prevenção em relação a rotação de mecanismos de detoxificação como forma de prevenção e evolução da resistência a herbicidas.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de incremento de metabolização como mecanismo de resistência de plantas daninhas aos herbicidas deve ser considerada um agravante no que se refere aos desafios no manejo de plantas daninhas resistentes. Várias espécies têm apresentado casos de biótipos com resistência múltipla e/ou cruzada devido ao incremento de metabolização, o que reduz as alternativas para o manejo e controle dessas plantas por meio da aplicação de herbicidas.

O conhecimento do mecanismo de resistência, assim como os genes e enzimas envolvidos é fundamental, uma vez que, a partir dessas informações, medidas adequadas no manejo podem ser tomadas. Medidas como a aplicação de herbicidas em momentos de menor atividade das enzimas detoxificadoras podem contribuir para o manejo dessas plantas daninhas. Além disso, a utilização de misturas sinérgicas, incluindo produtos inibidores de enzimas detoxificadoras, melhora a eficiência dos herbicidas e pode ser fundamental na prevenção da dispersão e controle da resistência devido ao incremento de metabolização.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BENEKOS, K. et al. Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 195-201, 2010.

BOWLES, D.; LIM, E.K. Glycosyltransferases of small molecules: their roles in plant biology. In: **ENCYCLOPEDIA of life sciences**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2010.

BRAZIER-HICKS, M.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. O-glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and

herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). **Phytochemistry**, New York, v. 59, n. 2, p. 149-156, 2002.

BUONO, D. D.; IOLI, G. Glutathione S-Transferases of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*): activity toward some chemicals, safener modulation and persistence of atrazine and fluorodifen in the shoots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 4, p. 1324-1329, 2011.

BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, Malden, v. 6, n. 2, p. 231-242, 2013.

CARVALHO, L. B. et al. Differential content of glyphosate and its metabolites in *Digitaria insularis* biotypes. **Communications in Plant Sciences**, [Lages], v. 3, n. 3-4, p. 17-20. 2013.

CARVALHO, S. J. P. et al. Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 1, p. 136-142, 2009.

CHRISTOPHER, J. T. et al. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). II. Chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 95, n. 4, p. 1036-1046, 1991.

CUMMINS, I. et al. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 15, p. 5812-5817, 2013.

CUMMINS, I. et al. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 43, n. 2, p. 266-280, 2011.

DALAZEN, G. et al. Efeito de inibidores de enzimas P450 sobre plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, n. 9, 2015, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SOSBAI, 2015a. p. 799-802.

DALAZEN, G. et al. Genes relacionados à detoxificação de imazethapyr em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, n. 9, 2015, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SOSBAI, 2015b. p. 840-843.

DÉLYE, C. et al. Molecular mechanisms of herbicide resistance. **Weed Science**, Champaign, v. 63, n. 1, p. 91-115, 2015.

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**, London, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2013.

DEVINE, M.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. 441p.

DIXON, D. P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2002.

EDWARDS, R. et al. New perspectives on the metabolism and detoxification of synthetic compounds in plants. In: SCHRÖDER, P.; COLLINS, C. D. (Ed.). **Organic xenobiotics and plants: from mode of action to ecophysiology**. New York: Springer, 2011. v. 8, p. 125-148.

ELDEEN, D.; RADWAN, M. Salicylic acid induced alleviation of oxidative stress caused by clethodim in maize (*Zea mays* L.) leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 102, n. 2, p. 182-188, 2012.

ELMORE, M.T. et al. Cytochrome P450 inhibitors reduce creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) tolerance to topramezone. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. 1-10, 2015.

FRAGA, M. I.; TASENDE, M. G. Mechanisms of resistance to simazine in *Sonchus oleraceus*. **Weed Research**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 333-340, 2003.

FRELET-BARRAND, A. et al. Comparative mutant analysis of Arabidopsis ABCC-type ABC transporters: AtMRP2 contributes to detoxification, vacuolar organic anion transport and chlorophyll degradation. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 557-569, 2008.

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

GLOSTER, T. M. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 28, n. 1, p. 131-141, 2014.

GODAR, A. S. et al. Physiological and molecular mechanisms of differential sensitivity of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to mesotrione at varying growth temperatures. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. 1-17, 2015.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F. et al. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza Canadensis* L. Cronq) biotypes. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 169, n. 17, p. 1673-1679, 2012.

GRESSEL, J. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, London, v. 65, n. 11, p. 1164-1173, 2009.

HAN, H. P. et al. Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. **Crop Protection**, Guildford, v. 65, n. 1, p. 57-63, 2014.

HATZIOS, K. K. Biotransformations of herbicides in higher plants. In: Grover, R.; Cessna, A.J. (Ed.). **Environmental chemistry of herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991, 312 p.

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

HEAP, I. **The International survey of herbicide resistant weeds**. 2015. Disponível em: <www.weedscience.com>. Acesso em: 23 set. 2015.

HIROSE, S. et al. Tissue-specific expression of rice CYP72A21 induced by auxins and herbicides. **Plant Biotechnology Report**, Tokio, v.1, n.1, p.27-36, 2007.

HOAGLAND, R. E. Metabolically based resistance to the herbicide propanil in *Echinochloa* species. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 475-486, 2004.

HU, T. A glutathione S-transferase confers herbicide tolerance in rice. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 76-81, 2014.

HUAN, Z. et al. Resistance level and metabolism of barnyard-grass (*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.) populations to quizalofop-p-ethyl in heilongjiang province, China. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 10, n. 12, p. 1914-1922, 2011.

ISMAIL, B. S.; JULIANA, B. K.; CHUAH, T. S. Propanil resistance in sprangletop (*Leptochloa chinensis* [L.] Nees) caused by enhanced propanil detoxification. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 45, n. 6, p. 2111-2117, 2013.

IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014a.

IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, London, v. 70, n. 4, p. 549-558, 2014b.

KAISER, Y. I.; GERHARDS, R. Degradation and metabolism of fenoxaprop and mesosulfuron + iodosulfuron in multiple resistant blackgrass (*Alopercurus myosuroides*). **Gesunde Pflanzen**, Berlin, v. 67, n. 3, p. 109-117, 2015.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job: herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 111, n. 2, p. 349-353, 1996.

LI, G. et al. Identification and expression pattern of a glutathione S-transferase in *Echinochloa crus-galli*. **Weed Research**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 314-321, 2013.

LIU, C.. Expression of a rice CYP81A6 gene confers tolerance to bentazon and sulfonylurea herbicides in both *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 3, p. 419-428, 2012.

MAHAN, J. R.; DOTRAY, P. A.; LIGHT, G. G. Thermal dependence of enzyme function and inhibition: implications for herbicide efficacy and tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 2, p. 187-195, 2004.

MATZENBACHER, F. de O. et al. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015.

MILNER, L. J.; READE, J. P. H.; COBB, A. H. The effect of temperature on glutathione S-transferase activity and glutathione content in *Alopecurus myosuroides* (black grass) biotypes susceptible and resistant to herbicides. **Weed Research**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 106-112, 2007.

NARDEMIR, G. et al. Determination of genetic and epigenetic effects of glyphosate on *Triticum aestivum* with RAPD and CRED-RA techniques. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Rio Claro, v. 27, n. 2, p. 131-139, 2015.

NELSON, D.; WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **Plant Journal**, Oxford, v. 66, n. 1, p. 194-211, 2011.

ÖZTETIK, E. A. Tale of Plant Glutathione S-Transferases: Since 1970. **Botanical Review**, Bronx, v. 74, n. 3, p. 419-437, 2008.

PAN, G. et al. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, n. 6, p. 933-943, 2006.

PAN, G. et al. Non-target site mechanism of metribuzin tolerance in induced tolerant mutants of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). **Crop & Pasture Science**, Victoria, v. 63, n. 5, p. 452-458, 2012.

PANG, S. et al. Co-induction of a glutathione-s-transferase, a glutathione transporter and an ABC transporter in maize by xenobiotics. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. 1-5, 2012.

PERSANS, M. W.; WANG, J.; SCHULER, M. A. Characterization of maize cytochrome P450 monooxygenases induced in response to safeners and bacterial pathogens. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, n. 2, p. 1126-1138, 2001.

GRONWALD, J. W.; PLAISANCE, K. L. Enhanced catalytic constant for glutathione s-transferase (atrazine) activity in an atrazine-resistant *Abutilon theophrasti* biotype. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 63, n. 1, p. 34-49, 1999.

POWLES, S. B.; SHANER, D. L. (Ed.). **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 301p.

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

READE, J. P. H.; MILNER, L. J.; COBB, A. H. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 468-474, 2004.

REMY, E.; Duque, P. Beyond cellular detoxification: a plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 5, n. 201, p. 1-10, 2014.

SCHRÖDER, P.; COLLINS, C. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 247-265, 2002.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochemistry Reviews**, New York, v. 5, n. 1, p. 445-458, 2006.

SIMINSZKY, B. et al. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 4, p. 1750-1755, 1999.

SKIDMORE, M.W. Bound residues arising from the use of agrochemicals on plants. In: Roberts, T. (Ed.) **Metabolism of Agrochemicals in Plants**, 2000. Chichester: Wiley, p. 155-178.

TANI, E.; CHACHALIS, D.; TRAVLOS, I. S. A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporter genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2015.

TAUSZ, M. The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. In: GRILL, D.; TAUSZ M.; KOK, L. J. de. (Ed.) **Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.101-122.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000.

WINDSOR, B.; ROUX, S. J.; LLOYD, A. Multiherbicide tolerance conferred by AtPgp1 and apyrase overexpression in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 4, p. 428-433, 2003.

XI, J.; XU, P.; XIANG, C. B. Loss of AtPDR11, a plasma membrane-localized ABC transporter, confers paraquat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 69, n. 5, p. 782-791, 2012.

XIANG, W.; WANG, X.; REN, T. Expression of a wheat cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast catalyzes the metabolism of sulfonylurea herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 85, n. 1, p. 1-6, 2006.

YAMADA, T. et al. Molecular cloning of novel cytochrome P450 species induced by chemical treatments in cultured tobacco cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 68, n. 1, p. 11-25, 2000.

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

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

YU, H. et al. Enhanced rates of herbicide metabolism in low herbicide-dose selected resistant *Lolium rigidum*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 818-827, 2013.

YU, J.; MCCULLOUGH, P. E.; GREY, T. Physiological effects of temperature on turfgrass tolerance to amicarbazone. **Pest Management Science**, London, v. 71, n. 4, p. 571-578, 2015.

YU, Q.; POWLES, S. B. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 66, n. 3, p. 1106-1118, 2014.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; NEAL, S. J. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

YUN, M. S. et al. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 83, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

3 CAPÍTULO 2- EFEITO DE INIBIDORES E INDUTORES DE ENZIMAS P450 SOBRE PLANTAS DE CAPIM-ARROZ TRATADAS COM IMAZETHAPYR

RESUMO

A ocorrência de resistência a herbicidas causada por incremento de metabolização é um problema crescente em diversas espécies de plantas daninhas. A identificação deste mecanismo de resistência pode ser realizada através da aplicação de compostos que afetam a atividade de enzimas detoxificadoras. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de inibidores e indutores de enzimas citocromo P450 monooxigenases (P450) como forma de identificação da ocorrência de degradação do herbicida imazethapyr em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente a este herbicida. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação, e os compostos foram aplicados através de aspersão em plantas com três a quatro folhas. Foram avaliados o efeito da aspersão prévia e simultânea dos inibidores malathion e butóxido de piperonila (PBO) e do indutor de enzimas P450 anidrido naftálico (AN) em interação com imazethapyr em capim-arroz suscetível e resistente ao herbicida imazethapyr. A quantificação de degradação do herbicida imazethapyr foi avaliada em tecido foliar que recebeu imazethapyr isolado ou em adição a malathion. A aspersão prévia de inibidores de P450, principalmente malathion, causou incremento no controle e redução no acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) e do fator de resistência (FR) nas populações resistentes. O FR de resistência na população resistente PALMS01 foi reduzido de 15,92 para 3,44 e 4,99 com a aspersão prévia de malathion e PBO, respectivamente. De maneira oposta, a aspersão prévia de AN causou a redução no controle e o aumento no acúmulo de MMSPA e do FR, o qual passou de 4,45 para 8,32. A aspersão prévia de malathion proporcionou o aumento na concentração de imazethapyr em 0,042 mg de imazethapyr kg⁻¹ de folhas de capim-arroz, em relação às plantas aspergidas apenas com o herbicida, indicando a redução da atividade das enzimas detoxificadoras. A aspersão simultânea de malathion e imazethapyr, independentemente da dose do inibidor, foi menos eficiente que a aspersão prévia do inibidor. O incremento de metabolização por enzimas P450 está envolvido no mecanismo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr.

CHAPTER 2- EFFECT OF CYTOCHROMO P450 MONOXIGENASES INHIBITORS AND INDUCTORS ON BARNYARDGRASS RESISTANT TO IMAZETHAPYR

ABSTRACT

The evolution of herbicide resistant weeds caused by enhancement degradation is an increasing problem in several weeds. The identification of this resistance of mechanism of weeds can be obtained through of the spraying of compounds that affect the activity of detoxifying enzymes. The aim of this study was to evaluate the effect of inhibitors and inducers of cytochrome P450 monooxygenases (P450) enzymes to identify of the occurrence of imazethapyr degradation herbicide resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). The experiments were performed in greenhouse and the compounds were sprayed in three to four leaf stage plants. The P450 inhibitors malathion and piperonyl butoxide (PBO) and the inducer naphthalic anhydride (NA) applied simultaneously or sequentially with imazethapyr was evaluated on susceptible and imazethapyr resistant barnyardgrass. In addition, the degradation of imazethapyr was analyzed in plants treated with imazethapyr applied alone or two hours after malathion. The previous spray of P450 inhibitors, particularly malathion, increase the effect of imazethapyr in resistant populations. The spraying of malathion and PBO prior to imazethapyr reduced the RF from 15.92 to 3.44 and 4.99, respectively, in the population PALMS01. Conversely, the P450 inductor AN increased the RF from 4.45 to 8.32. The effect of malathion increase the concentration of imazethapyr at 0.042 mg kg⁻¹ in barnyardgrass leaves in comparison to plants sprayed with the herbicide alone, indicating decreased activity of the detoxifying enzymes. The simultaneous spraying of malathion and imazethapyr, regardless of the inhibitor dose, was less efficient than the sequential application of this inhibitor. The degradation enhancement caused by P450 enzymes are involved in the resistant mechanism of barnyardgrass to imazethapyr.

3.1 INTRODUÇÃO

O capim-arroz é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz irrigado no sul do Brasil (Agostinetto *et al.*, 2010). Essa planta daninha pode provocar perdas de até 90% na produtividade do arroz, dependendo da densidade da infestante, cultivar e manejo da irrigação da lavoura (Pinto *et al.*, 2008), o que demanda o emprego de métodos de controle. O método químico é o mais utilizado para o controle dessa planta daninha, sendo que os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) são amplamente utilizados.

Os herbicidas inibidores da enzima ALS inibem as reações de condensação responsáveis pela síntese dos aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Powles & Yu, 2010). Entre as características favoráveis desses herbicidas estão a utilização de pequenas doses, o amplo espectro de controle, a ampla janela de aplicação, a atividade residual no solo, a seletividade sobre as culturas e a baixa toxicidade sobre mamíferos (Tranel & Wrigth, 2002). No entanto, trata-se de herbicidas propensos a selecionarem populações resistentes devido à alta taxa de mutação natural no gene *ALS* (10^{-6} a 10^{-4}) e à capacidade de serem detoxificados por plantas (Preston & Powles, 2002; Carvalho *et al.*, 2009). Esses fatores, somados ao uso intenso, selecionaram populações de plantas daninhas de diversas espécies com resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS (Heap, 2016), fazendo com que este seja atualmente um dos principais problemas destes herbicidas.

A resistência aos inibidores da ALS pode ser devida a mutações no gene *ALS*, tornando a enzima ALS insensível aos herbicidas. Porém, mecanismos não relacionados ao local de ação (NRLA) têm sido investigados como causa da resistência, incluindo casos de resistência múltipla e cruzada (Yu & Powles, 2014). Entre os mecanismos destaca-se o incremento de detoxificação por enzimas citocromo P450 monooxigenases

(P450) (Powles & Yu, 2010), conhecidas como enzimas-chave na fase I do metabolismo de xenobióticos, e de papel fundamental da detoxificação de herbicidas em plantas (Yun *et al.*, 2005). Essas enzimas são responsáveis pela adição de um átomo de oxigênio à molécula de herbicida, reduzindo sua toxicidade antes que alcance o local de ação (Werck-Reichhart *et al.*, 2000). Esse mecanismo de detoxificação também é responsável pela tolerância de culturas a determinados herbicidas, conferindo-lhes seletividade sobre as plantas (Liu *et al.*, 2012).

A detecção da ocorrência de detoxificação de herbicidas por enzimas P450 pode ser realizada por meio do uso de inibidores enzimáticos (Yasour *et al.*, 2009). Entre eles estão o butóxido de piperonila (PBO) e o inseticida organofosforado malathion (Siminszky, 2006). De maneira oposta, alguns compostos agem como indutores de enzimas P450, aumentando a tolerância da planta aos herbicidas. Esses compostos são conhecidos como *safeners* e entre eles está o anidrido naftálico (AN), um composto que induz a expressão de genes *P450* em poáceas (Hatzios & Burgos, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos inibidores (PBO e malathion) e do indutor (anidrido naftálico) de enzimas P450 sobre plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes e suscetíveis ao herbicida imazethaphyr.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A superação da dormência das sementes para todos os experimentos foi realizada por meio da imersão das sementes em solução de KNO₃ (0,2%), em temperatura de 25°C, até o início da germinação (emissão da radícula), o que ocorreu, aproximadamente, aos quatro dias após o tratamento. Após, as sementes foram

enxaguadas em água destilada e acondicionadas em placas de Petri mantidas em temperatura de 25°C até a emissão da primeira folha. O transplante das plântulas foi realizado em vasos preenchidos com substrato, formado pela mistura de solo do tipo argissolo e composto orgânico, na proporção de 10:1, além da complementação com fertilizante mineral. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação climatizada, com temperatura de 25-27°C, umidade relativa do ar de aproximadamente 70% e fotoperíodo de 14/10 horas (dia/noite).

3.2.1 Experimento 1- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se a metodologia de curvas de dose-resposta, com quatro repetições. As plantas foram cultivadas individualmente em vasos com capacidade de 200 mL, perfurados e mantidos submersos com água até o nível do solo. Foram utilizadas quatro populações de capim-arroz (fator A), sendo duas suscetíveis (SUSSP01 e MOSTS01) e duas resistentes (ARRGR01 e PALMS01) ao herbicida imazethapyr. Os inibidores de enzimas P450 (fator B) avaliados foram o butóxido de piperonila (PBO) e o malathion. Ambos foram aspergidos na dose de 1000 g ha⁻¹, duas horas antes da aplicação do herbicida. Os níveis de doses de imazethapyr (fator C) utilizados nas populações suscetíveis foram 0; 6,625; 13,25; 26,5; 53; 106 e 212 g ha⁻¹. Nas resistentes, foram 0; 26,5; 53; 106; 212; 424 e 848 g ha⁻¹. Baseado em experimentos prévios, o intervalo de doses utilizadas nas populações suscetíveis foi menor, uma vez que as plantas são mais sensíveis ao herbicida imazethapyr. Em todos os tratamentos foi acrescido o adjuvante Dash na dose de 0,5% v/v.

A aspersão dos tratamentos foi realizada quando as plantas se encontravam com três folhas. Para isso, foi utilizada câmara de pulverização automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), utilizando-se ponta de pulverização TJ8002E, com pressão constante de 42 lb pol⁻² e velocidade de deslocamento de 1,16 m s⁻¹, gerando o volume de calda de 200 L ha⁻¹.

O controle foi avaliado aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) por meio de escala percentual determinada através de avaliação visual, em que zero significa ausência de sintomas e 100% significa morte da planta. A massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) foi mensurada aos 28 DAT, após a secagem das plantas em estufa (60°C) até as mesmas atingirem massa constante. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ajustados pelo modelo logístico de 3 parâmetros [(y= a/1+(x/x₀)^b]. Para a determinação dos valores de C₅₀, o y da equação foi substituído por 50 (50% de controle), conforme proposto por Carvalho *et al.* (2005). Para os fatores qualitativos (populações de capim-arroz e inibidores de enzimas P450), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). Os dados percentuais de controle foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

3.2.2 Experimento 2- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico.

A metodologia referente às populações de capim-arroz, produção das plantas, aspersão dos tratamentos, doses de imazethapyr, avaliações e análise estatística foi similar a utilizada no experimento 1. No entanto, o fator B foi composto pela presença ou ausência de anidrido naftálico (AN), um indutor de enzimas P450. O AN foi aplicado na dose de 1000 g ha⁻¹, duas horas antes da aplicação do herbicida.

3.2.3 Experimento 3- Quantificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz em resposta à aspersão prévia de malathion e anidrido naftálico.

Após a germinação, as plântulas foram transplantadas para caixas plásticas contendo uma camada de dez centímetros de substrato. Em cada caixa foram transplantadas 40 plântulas de uma mesma população, compondo uma unidade experimental. Cada tratamento teve duas repetições. Foram utilizadas duas populações de capim-arroz, sendo uma suscetível (SUSSP01) e outra resistente (PALMS01) ao herbicida imazethapyr. Em experimento prévio (experimento 1), a população PALMS01 teve a resistência consideravelmente revertida com a aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO).

A concentração de imazethapyr foi quantificada em tratamentos que consistiram em combinações do herbicida imazethapyr na dose recomendada (106 g ha^{-1}) com a aplicação prévia de malathion ou anidrido naftálico, ambos na dose de 1000 g ha^{-1} , sobre a população resistente (PALMS01) (tabela 1). Além desses tratamentos, também foi quantificada a concentração de imazethapyr em plantas resistentes (PALMS01) tratadas apenas com imazethapyr, e também em plantas não tratadas. Ainda, foi quantificada a concentração de imazethapyr em plantas suscetíveis (SUSSP01) tratadas com o herbicida.

A aspersão dos tratamentos foi realizada quando as plantas encontravam-se no estágio de desenvolvimento de 3-4 folhas. Os procedimentos da aspersão dos tratamentos foram similares aos descritos anteriormente (experimento 1). A parte aérea das plantas foi coletada aos 7 DAT. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em gelo e posteriormente congeladas até o momento do preparo das amostras e quantificação do imazethapyr em laboratório.

TABELA 1. Tratamentos avaliados na quantificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) em resposta à aspersão prévia de malathion (inibidor de P450) e anidrido naftálico (indutor de P450). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento	População	Resposta a Imazethapyr	Inibidor/ Indutor	Dose de imazethapyr
T1	SUSSP01	Suscetível	-	106 g ha ⁻¹
T2	PALMS01	Resistente	malathion*	106 g ha ⁻¹
T3	PALMS01	Resistente	anidrido naftálico*	106 g ha ⁻¹
T4	PALMS01	Resistente	-	106 g ha ⁻¹
T5	PALMS01	Resistente	-	-

*aspersado duas horas antes da aspersão de imazethapyr, na dose de 1000 g ha⁻¹.

A aspersão dos tratamentos foi realizada quando as plantas encontravam-se no estágio de desenvolvimento de 3-4 folhas. Os procedimentos da aspersão dos tratamentos foram similares aos descritos anteriormente (experimento 1). A parte aérea das plantas foi coletada aos 7 DAT. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em gelo e posteriormente congeladas até o momento do preparo das amostras e quantificação do imazethapyr em laboratório. As análises de imazethapyr foram realizadas no laboratório NSF Bioensaios, em Viamão, RS. Cada amostra foi composta por 2,5 g de tecido vegetal processado e homogeneizado. Em seguida, foram adicionados 10 mL da solução de ácido acético 0,1% em acetonitrila (grau HPLC). As amostras foram agitadas em agitador tipo “vortex” por 1 min. Após, foram adicionados 3 g de sulfato de magnésio anidro, 1,7 g de acetato de sódio anidro e 1 g de cloreto de sódio. As amostras foram agitadas em agitador tipo “vortex” por 1 min e centrifugadas por 7 min a 4000 rpm. Em seguida, foi transferido 1 mL de sobrenadante para tubo ependorfe contendo 0,15 g de sulfato de magnésio anidro. As amostras foram agitadas vigorosamente (agitação manual) e centrifugadas por 2 min a 5200 rpm. Após a centrifugação, foi transferido 1 mL do extrato para tubo de ependorfe e adicionado 1 mL de metanol (grau HPLC). Em seguida, o extrato foi filtrado em membrana filtrante

de 0,45 µm de PTFE e acondicionado em vial. As amostras foram homogeneizadas manualmente, antes de se proceder a análise cromatográfica. A análise cromatográfica foi realizada pelo protocolo POP-05.130.BIOENSAIOS.

3.2.4 Experimento 4- Mistura simultânea de imazethapyr com diferentes doses de malathion no controle de capim-arroz resistente a imidazolinonas

O experimento foi conduzido em vasos com volume de 200 mL, com quatro repetições. As populações utilizadas foram a ARRGR01 e PALMS01, ambas resistentes ao herbicida imazethapyr. Os tratamentos avaliados consistiram da combinação da dose recomendada de imazethapyr (106 g ha⁻¹) com doses de malathion de 0,67; 1,00; 1,50; 2,25; 3,37; 5,06 e 7,59 kg ha⁻¹, formando curvas de dose-resposta. Todos os tratamentos que receberam imazethapyr tiveram a adição de adjuvante (Dash 0,5% v/v). A aspersão do inibidor de P450 malathion foi realizada juntamente com o herbicida, quando as plantas se encontravam com três folhas. Os procedimentos da aspersão dos tratamentos foram similares aos descritos anteriormente (experimento 1).

O controle foi avaliado aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) por meio de escala visual de controle, em que zero significa ausência de sintomas e 100 significa morte da planta. A massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) foi mensurada aos 21 DAT, após a secagem das plantas em estufa (60°C) até as mesmas atingirem massa constante. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) e ajustados pelo modelo linear ($y = a + bx$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Experimento 1- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450.

A ANOVA da avaliação visual de controle de capim arroz aos 7 DAT apresentou interação tripla entre os fatores avaliados, indicando que o efeito da aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 é variável de acordo com a população de capim-arroz e a dose do herbicida imazethapyr (anexo 1a) (figura 1). A inibição das enzimas P450 foi mais significativa na população resistente PALMS01 (figura 1d). Sobretudo para o inibidor malathion e nas menores doses de imazethapyr, uma vez que o controle de plantas foi superior em relação à aplicação de apenas o herbicida, ou seja, sem a aplicação prévia de inibidor. Nessa população, na dose de 26,5 g ha⁻¹ de imazethapyr, o incremento de controle foi de aproximadamente 28% e 12,5% com a aspersão prévia de malathion e PBO, respectivamente, em relação às plantas tratadas apenas com o herbicida, as quais tiveram controle de 16%. Com o aumento da dose do herbicida, o incremento no controle diminuiu, sendo que na dose recomendada (106 g ha⁻¹) o controle foi 12,5% e 5% superior com a aspersão prévia de malathion e PBO, respectivamente.

O efeito da aspersão prévia dos inibidores de enzimas P450 sobre o controle de capim-arroz com imazethapyr também foi evidenciado nos valores de C₅₀, calculados a partir dos parâmetros estimados pelo modelo matemático (tabela 2), e no fator de resistência (FR) (tabela 3), calculado a partir dos valores de C₅₀. Para os tratamentos que não receberam inibidores de metabolização, o FR foi de 4,87. Contudo, com a aspersão prévia de malathion e PBO, os FRs foram reduzidos para 2,24 e 3,18, respectivamente.

Na população resistente ARRGR01 (figura 1c) também houve incremento no controle com a aspersão prévia de inibidores de enzimas P450, porém em menor proporção em relação à população PALMS01. Em relação às populações suscetíveis SUSSP01 (figura 1a) e MOSTS01 (figura 1b), a aspersão prévia de inibidores não apresentou efeito sobre o controle, exceto para as duas menores doses do herbicida (6,625 e 13,25 g ha⁻¹) na população SUSSP01, com incremento de controle de 12% a 15% para ambos os inibidores avaliados.

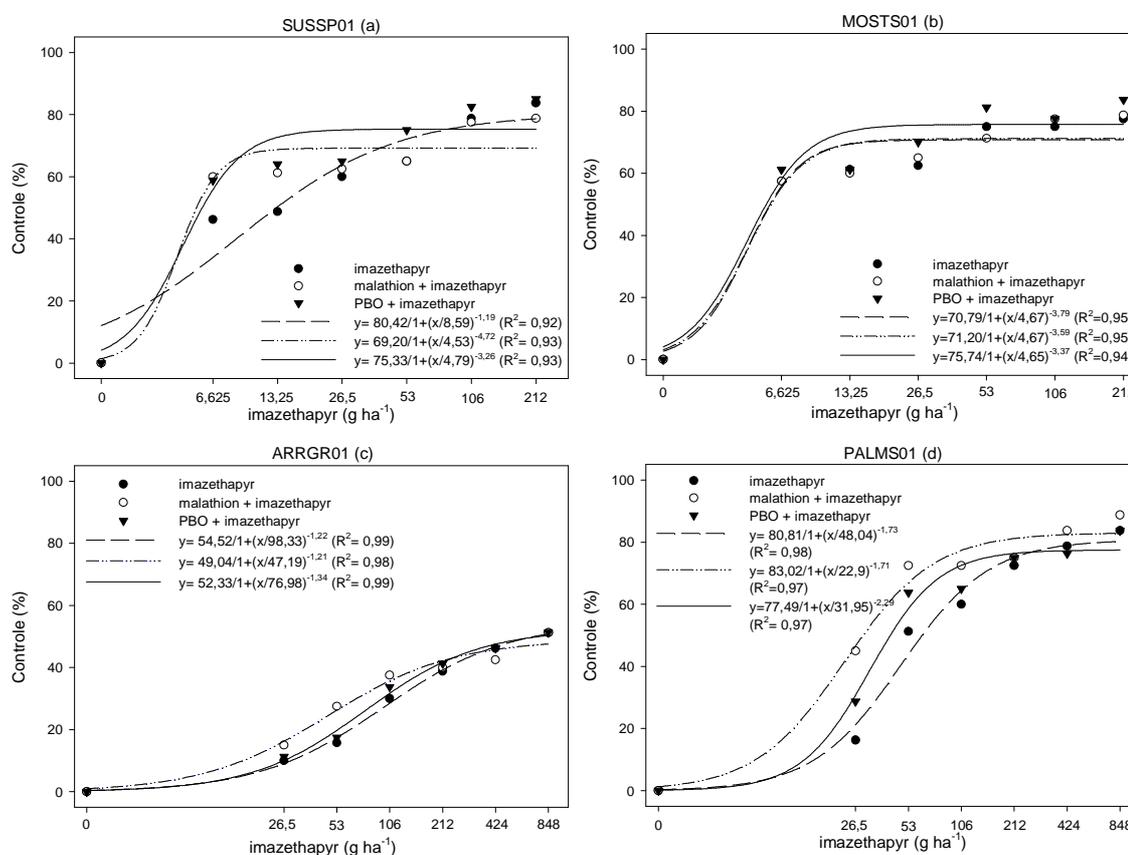


FIGURA 1. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

A avaliação visual de controle aos 14 DAT (figura 2) e a ANOVA (anexo 1b), de forma semelhante ao observado aos 7 DAT, demonstram que a aspersão prévia de

inibidores de metabolização não apresentou efeito nas populações suscetíveis (figuras 2a e 2b). No entanto, nas populações resistentes (figuras 2c e 2d) foi observado significativo incremento de controle, principalmente na PALMS01, onde ocorreu redução no crescimento das plantas (figura 3). Nesta população, ocorreu incremento de controle em todas as doses de imazethapyr avaliadas, chegando a aproximadamente 41% em plantas tratadas previamente com malathion, na dose de 26,5 g ha⁻¹ deste herbicida. Consequentemente, houve redução no FR que foi 12,99 para as plantas tratadas apenas com imazethapyr ao passo que os inibidores malathion e PBO o reduziram para 4,81 e 10,88, respectivamente.

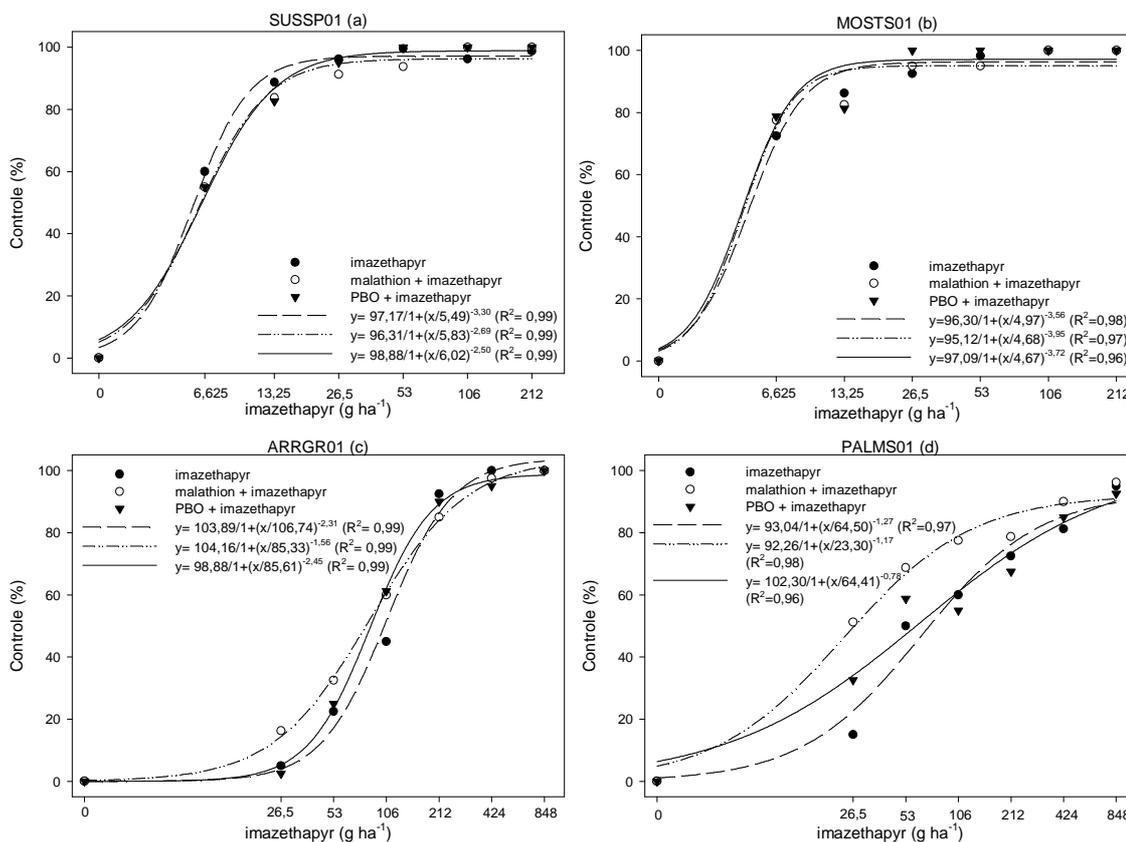


FIGURA 2. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Na população ARRGR01 (figura 2c), o incremento de controle foi observado apenas nas menores doses do herbicida, com aumento de aproximadamente 11% no controle de plantas tratadas previamente com malathion. Esse incremento no controle resultou na redução do FR de 18,49 para 14,51 e 15,46 com a aspersão prévia de malathion e PBO, respectivamente (tabela 3).

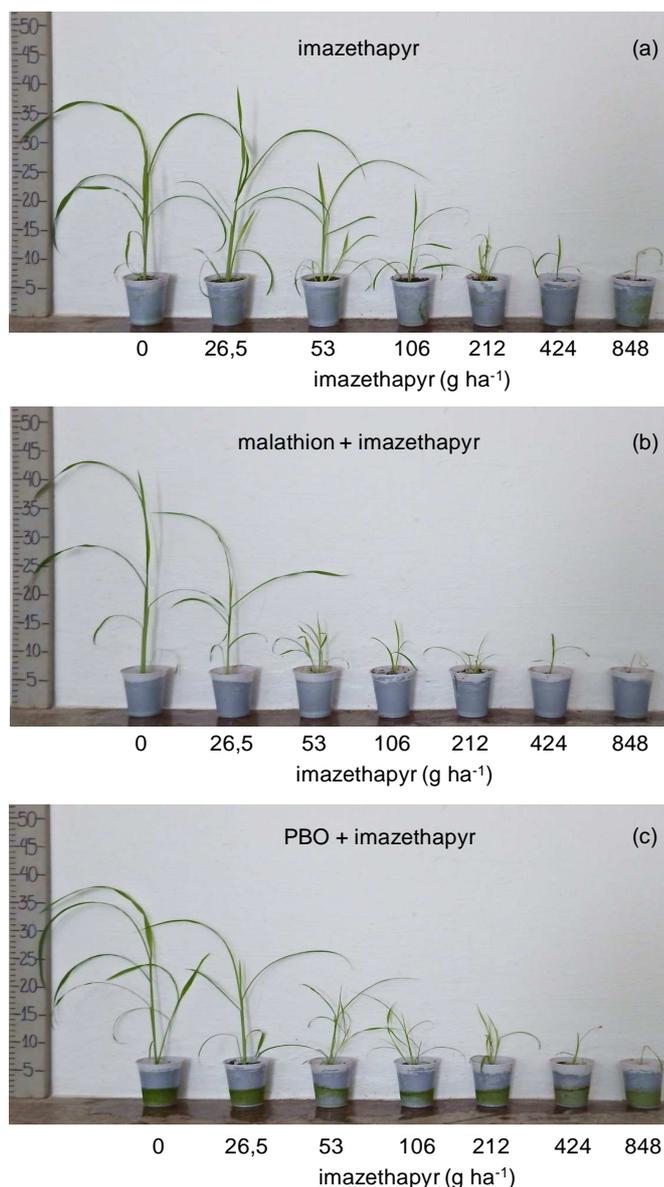


FIGURA 3. Efeito visual da aplicação de imazethapyr (a) e de inibidores de enzimas P450 malathion (b) e PBO (c) sobre plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes ao herbicida imazethapyr (PALSM01), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos. Os inibidores foram aplicados duas horas antes da aplicação do herbicida imazethapyr, ambos na dose de 1000 g ha⁻¹. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

A resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 se manteve até a última avaliação, aos 21 DAT (figura 4), com efeitos mais pronunciados para o malathion na população PALMS01 (figura 4d), em que o incremento no controle chegou a 32,5% na dose de 26,5 e 53 g ha⁻¹ de imazethapyr. O FR de resistência foi reduzido de 11,3 para 5,31 e 8,59 com a aspersão prévia de malathion e PBO, respectivamente. De modo semelhante, nas menores doses, os inibidores apresentaram efeito no controle de plantas de capim-arroz da população MOSTS01 (figura 4b). Para as demais populações, a aspersão prévia de inibidores de metabolização não apresentou efeito sobre o controle.

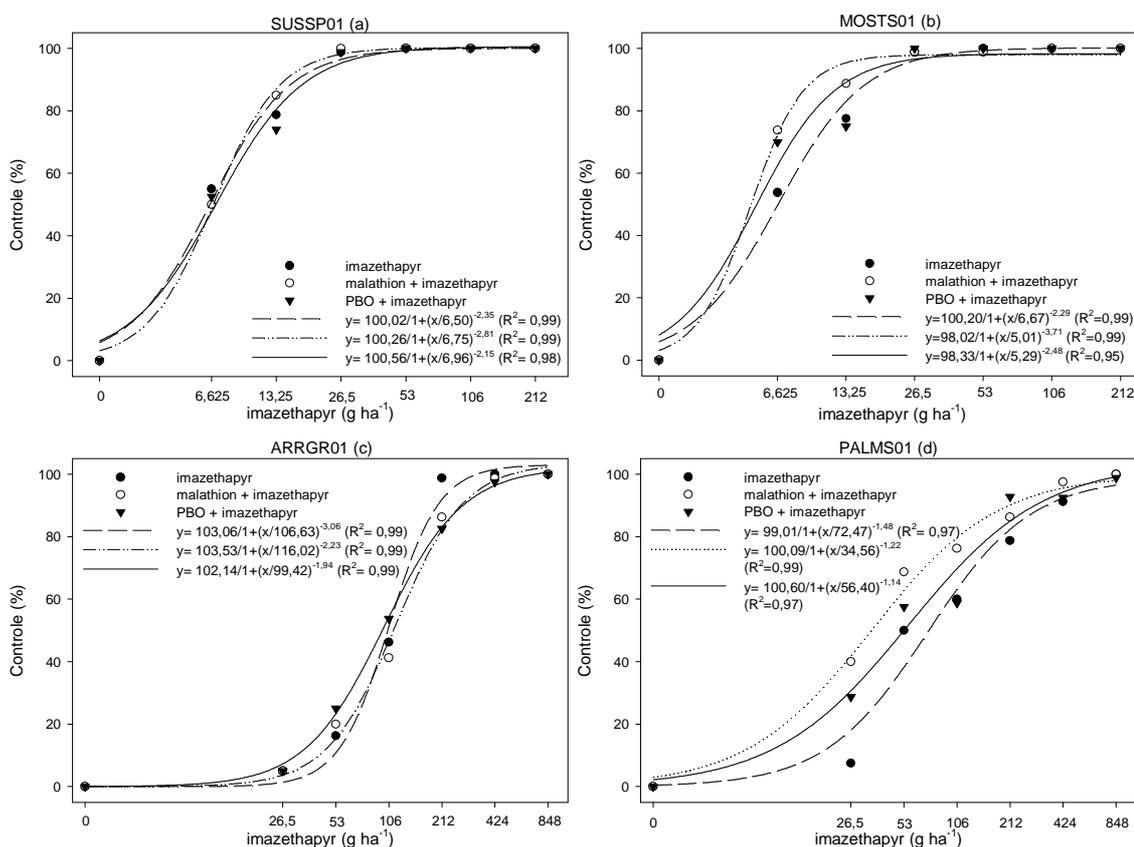


FIGURA 4. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Os resultados de acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) (figura 5) corroboram com os observados para as variáveis de avaliação visual de controle. As plantas pertencentes à população PALMS01 (figura 5d) apresentaram maiores reduções no acúmulo de MMSPA em resposta à aspersão prévia dos inibidores enzimáticos, principalmente malathion, e nas menores doses de imazethapyr (26,5; 53 e 106 g ha⁻¹). Na dose de 26,5 g ha⁻¹ de imazethapyr, a MMSPA foi reduzida cerca de 53% e 43% para os inibidores malathion e PBO, respectivamente. Para a dose de 53 g ha⁻¹ de imazethapyr, a redução foi de 50% (malathion) e 16% (PBO), e para a dose recomendada de imazethapyr (106 g ha⁻¹) a redução foi de 55% e 12,5%.

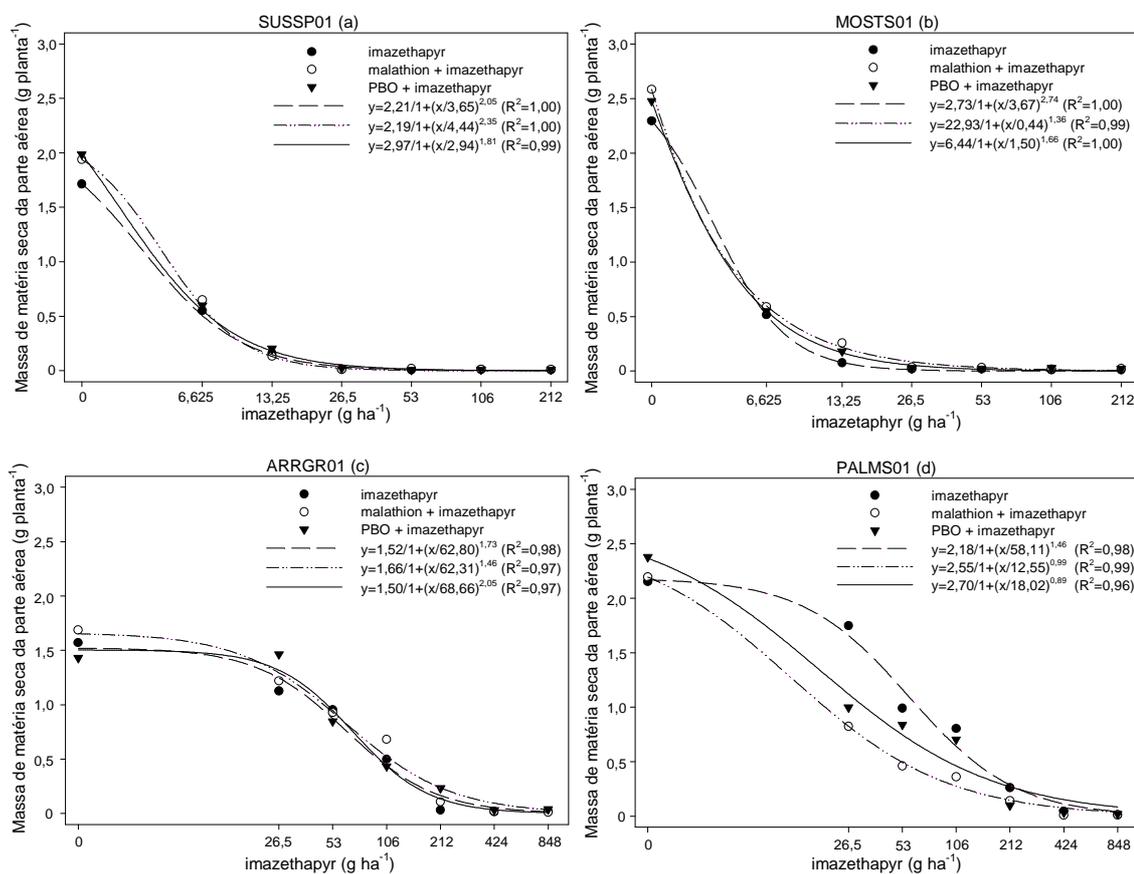


FIGURA 5. Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

TABELA 2. Parâmetros da equação logística e C_{50} para a variável controle de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO), aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento		a	b	X_0	C_{50} (g ha ⁻¹)	IC
7 DAT						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	80,42	-1,19	8,59	13,04	± 1,17
	Malathion + imazethapyr	69,2	-4,72	4,53	5,55	± 0,71
	PBO + imazethapyr	75,33	-3,26	4,79	5,90	± 0,44
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	70,79	-3,79	4,67	5,89	± 0,43
	Malathion + imazethapyr	71,2	-3,59	4,67	5,93	± 0,41
	PBO + imazethapyr	75,74	-3,37	4,65	5,66	± 0,41
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	54,52	-1,22	98,33	705,16	± 3,57
	Malathion + imazethapyr	49,04	-1,21	47,19	>848	± 3,38
	PBO + imazethapyr	52,33	-1,34	76,98	758,79	± 3,17
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	80,81	-1,73	48,04	63,56	± 2,44
	Malathion + imazethapyr	83,02	-1,71	22,9	29,19	± 1,61
	PBO + imazethapyr	77,49	-2,29	31,95	41,49	± 1,43
14 DAT						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	97,17	-3,3	5,49	5,59	± 0,09
	Malathion + imazethapyr	96,31	-1,56	5,83	6,12	± 0,16
	PBO + imazethapyr	98,88	-2,45	6,02	6,08	± 0,15
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	96,3	-3,56	4,97	5,08	± 0,21
	Malathion + imazethapyr	95,12	-3,95	4,68	4,80	± 0,31
	PBO + imazethapyr	97,09	-3,72	4,67	4,75	± 0,32
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	103,89	-2,31	106,74	103,33	± 3,66
	Malathion + imazethapyr	104,16	-1,56	85,33	81,07	± 1,23
	PBO + imazethapyr	98,88	-2,45	85,61	86,41	± 1,09
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	93,04	-1,27	64,5	72,58	± 5,96
	Malathion + imazethapyr	92,26	-1,17	23,3	26,90	± 1,61
	PBO + imazethapyr	102,3	-0,78	64,41	60,80	± 1,79
21 DAT						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	100,02	-2,35	6,50	6,50	± 0,18
	Malathion + imazethapyr	100,26	-2,81	6,75	6,74	± 0,08
	PBO + imazethapyr	100,56	-2,15	6,96	6,92	± 0,24
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	100,2	-2,29	6,67	6,66	± 0,19
	Malathion + imazethapyr	98,02	-3,71	5,01	5,06	± 0,17
	PBO + imazethapyr	98,33	-2,48	5,29	5,36	± 0,33
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	103,06	-3,06	106,63	104,58	± 2,88
	Malathion + imazethapyr	103,53	-2,23	116,02	112,52	± 3,34
	PBO + imazethapyr	102,14	-1,94	99,42	97,30	± 1,21
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	99,01	-1,48	72,47	73,46	± 6,16
	Malathion + imazethapyr	100,09	-1,22	34,56	34,51	± 1,70
	PBO + imazethapyr	100,6	-1,14	56,4	55,81	± 5,83

C_{50} : dose que causa 50% de controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro X_0 ($\alpha=0,05$).

Os FRs para a variável MMSPA (tabela 3) foram reduzidos consideravelmente com a aspersão prévia dos inibidores. Plantas que foram tratadas apenas com imazethapyr apresentaram FR de 15,92, ao passo que plantas tratadas previamente com malathion e PBO tiveram seus FRs reduzidos para 3,44 e 4,94, respectivamente. Para as demais populações, não houve redução no acúmulo de MMSPA e no FR com a aspersão prévia de malathion e PBO.

O incremento no controle e a redução no acúmulo de MMSPA e dos FRs em plantas resistentes tratadas previamente com malathion e PBO indicam que o incremento de metabolização do herbicida imazethapyr, devido à atividade de enzimas P450, esteja envolvido no mecanismo de resistência dessas populações. O efeito mais pronunciado foi observado quando o herbicida foi aplicado em doses menores ou igual à recomendada (106 g ha^{-1}), combinado com a aspersão prévia de malathion e em plantas pertencentes à população PALMS01.

TABELA 3. Fator de resistência de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO) para as variáveis controle aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

	Tratamento	Fator de resistência (FR)			
		7 DAT	14 DAT	21 DAT	MMSPA
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	1,00	1,00	1,00	1,00
	Malathion + imazethapyr	0,43	1,10	1,04	1,22
	PBO + imazethapyr	0,45	1,09	1,07	0,81
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	0,45	0,91	1,02	1,01
	Malathion + imazethapyr	0,45	0,86	0,78	0,12
	PBO + imazethapyr	0,43	0,85	0,83	0,41
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	54,07	18,49	16,09	17,21
	Malathion + imazethapyr	>65,23	14,51	17,31	17,07
	PBO + imazethapyr	58,18	15,46	14,97	18,81
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	4,87	12,99	11,30	15,92
	Malathion + imazethapyr	2,24	4,81	5,31	3,44
	PBO + imazethapyr	3,18	10,88	8,59	4,94

O efeito inibitório da aspersão prévia de malathion e PBO (experimento 1) demonstra que o incremento de metabolização por enzimas P450 atua como mecanismo de resistência nas populações de capim-arroz utilizadas neste estudo. Essas enzimas atuam por meio da catalisação de reações de monoxigenação dependentes de oxigênio e NADPH (Yuan *et al.*, 2007), tornando as moléculas de herbicidas menos tóxicas. A inibição de enzimas P450 por malathion ocorre quando o átomo de enxofre liberado pelo organofosfato oxigenado se liga e inibe a ação da enzima P450, aumentando a sensibilidade das plantas aos herbicidas (Werk-Reichhart *et al.*, 2000). A inibição por PBO resulta da formação de um complexo entre o grupamento heme da enzima P450 e uma molécula de carbene (carbono divalente) oriundo da hidroxilação da molécula de PBO, inibindo a atividade sobre o herbicida (Hodgson & Levi, 1998).

TABELA 4. Parâmetros da equação logística e GR₅₀ para a variável massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento	a	b	X ₀	GR ₅₀ (g ha ⁻¹)	IC	
	MMSPA					
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	2,21	2,05	3,65	3,65	± 0,11
	Malathion + imazethapyr	2,19	2,35	4,44	4,44	± 0,07
	PBO + imazethapyr	2,97	1,81	2,94	2,94	± 0,18
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	2,73	2,74	3,67	3,67	± 0,09
	Malathion + imazethapyr	22,93	1,36	0,44	0,44	± 0,40
	PBO + imazethapyr	6,44	1,66	1,50	1,50	± 0,26
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	1,52	1,73	62,8	62,80	± 3,56
	Malathion + imazethapyr	1,66	1,46	62,31	62,31	± 4,06
	PBO + imazethapyr	1,5	2,05	68,66	68,66	± 3,50
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	2,18	1,46	58,11	58,11	± 3,33
	Malathion + imazethapyr	2,55	0,99	12,55	12,55	± 1,38
	PBO + imazethapyr	2,7	0,89	18,02	18,02	± 4,41

GR₅₀: dose que causa redução de 50% no crescimento das plantas; IC: intervalo de confiança do parâmetro X₀ ($\alpha=0,05$).

O efeito desses compostos é relatado na literatura para uma série de espécies e herbicidas. Em *Lolium rigidum*, a utilização de malathion reverteu a resistência de biótipos resistentes a chlorsulfuron (Yu *et al.*, 2009). Em *Echinochloa phyllopogon*, tanto a aspersão prévia de PBO quanto de malathion aumentaram expressivamente a fitotoxicidade do herbicida bispyribac em plantas resistentes (Fischer *et al.*, 2000). Da mesma forma, em *E. phyllopogon*, o uso do inibidor de P450 malathion aumentou a fitotoxicidade do herbicida penoxsulam em plantas resistentes devido ao menor detoxificação do herbicida (Yasour *et al.*, 2009). O mesmo inibidor de metabolização foi utilizado para detectar o mecanismo de resistência de *Alopercurus myosuroides*. Com a associação de malathion, observou-se redução do fator de resistência ao herbicida flupyrulfuron (Letouze & Gasquez, 2003).

3.3.2 Experimento 2- Controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico.

A ANOVA da avaliação visual de controle aos 7 DAT indicou a ocorrência de interação significativa entre os fatores população e dose de imazethapyr (figura 6) (anexo 2a). Essa resposta era esperada, uma vez que se trata de populações resistentes e suscetíveis ao herbicida. Em relação aos fatores principais, a aspersão prévia de anidrido naftálico (AN) mostrou-se significativa, reduzindo o controle de plantas de capim-arroz. As maiores diferenças de controle foram observadas na população suscetível SUSSP01 (figura 6a) e na população resistente PALMS01 (figura 6d). Nas demais populações também ocorreu redução no controle de plantas, porém em menor proporção.

Na população PALMS01, a redução no controle com a aspersão prévia de NA ocorreu em todas as doses do herbicida, chegando a 23% em relação às plantas tratadas

com apenas imazetaphyr, na dose de 424 g ha⁻¹. Os fatores de resistência (FRs) das populações resistentes, calculados a partir do C₅₀ (tabela 5) foram reduzidos de um valor superior a 150 para 17,5 e 102 para as populações PALMS01 e ARRGR01, respectivamente, em resposta ao AN (tabela 7).

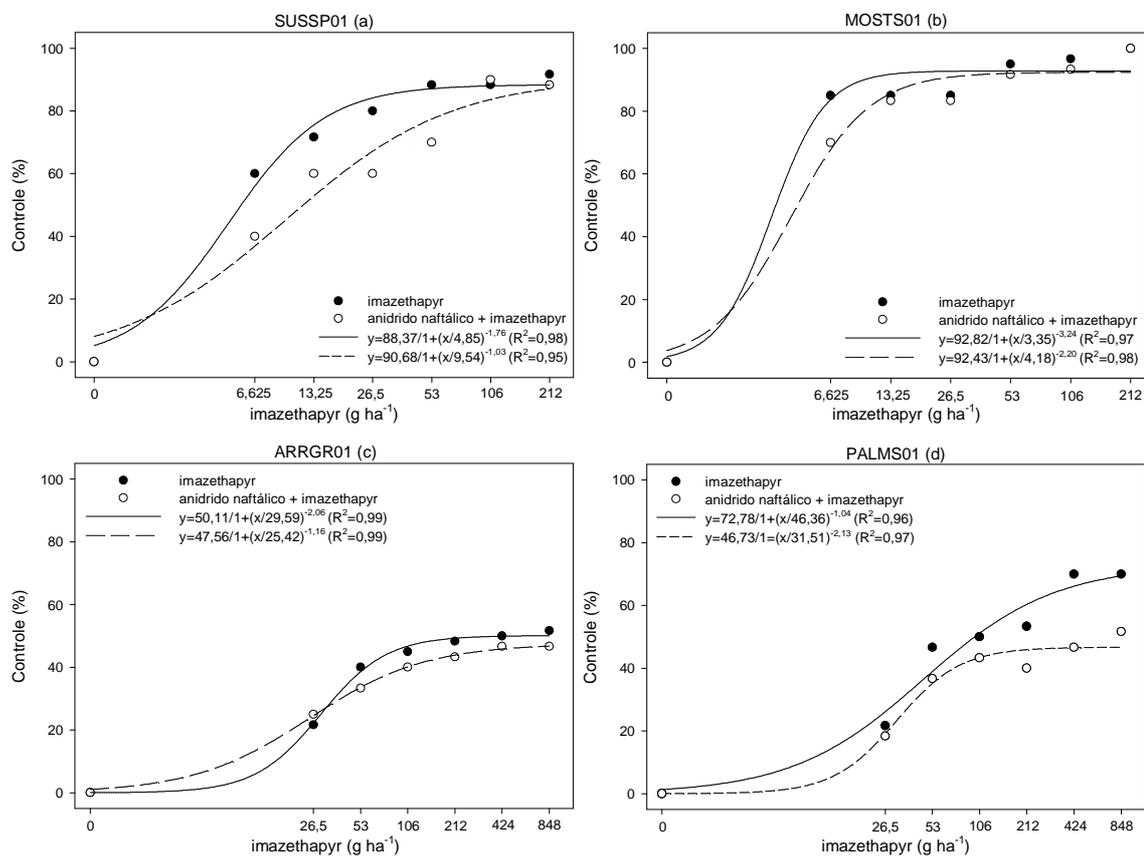


FIGURA 6. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Aos 14 DAT (figura 7 e anexo 2b), as interações entre os três os fatores população e dose de imazethapyr foram significativas. Além disso, a interação entre a população e a aspersão prévia de AN também se mostrou significativa, indicando que a redução de controle não ocorreu em todas as populações. As maiores reduções no controle de plantas de capim-arroz em resposta à aspersão prévia de AN ocorreu na

população resistente PALMS01 (figura 7d), com reduções chegando à 23% na dose recomendada do herbicida (106 g ha⁻¹). Essa redução no controle resultou na diminuição do C₅₀ (tabela 5) e, conseqüentemente, do FR (tabela 7), passando de 28,28 para 8,32 nas plantas tratadas com AN. Para as demais populações, embora tenham ocorrido variações no controle, não ocorreram variações expressivas nos valores de FR.

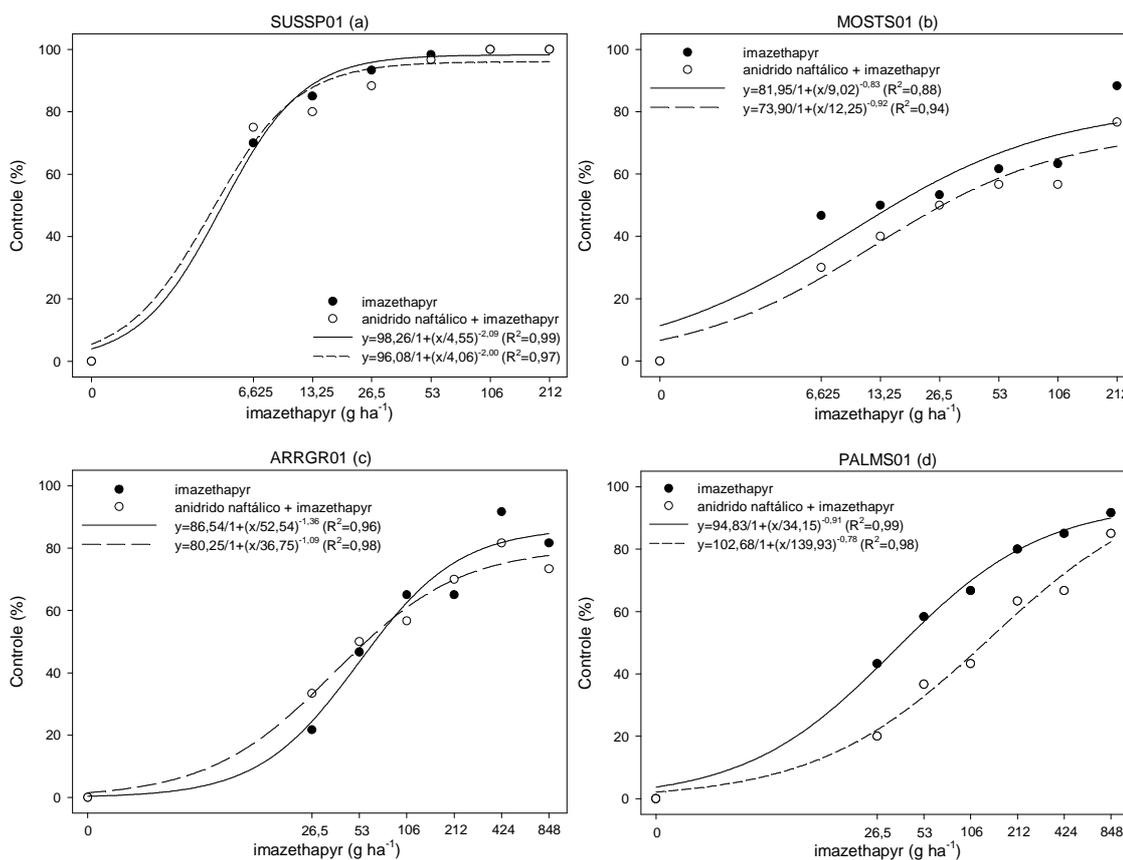


FIGURA 7. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

O controle aos 21 DAT (figura 8) e a ANOVA (anexo 2c) indicam que não houve significância na interação tripla entre os fatores. Porém, a interação entre os fatores população e dose de imazethapyr foi significativa. Em relação ao fator principal AN, não houve diferença significativa entre aplicá-lo ou não anteriormente ao herbicida.

Contudo, na população PALMS01 observou-se redução de controle, reduzindo-o em até 18%, o que refletiu na redução do FR em 7,94 vezes (tabela 7).

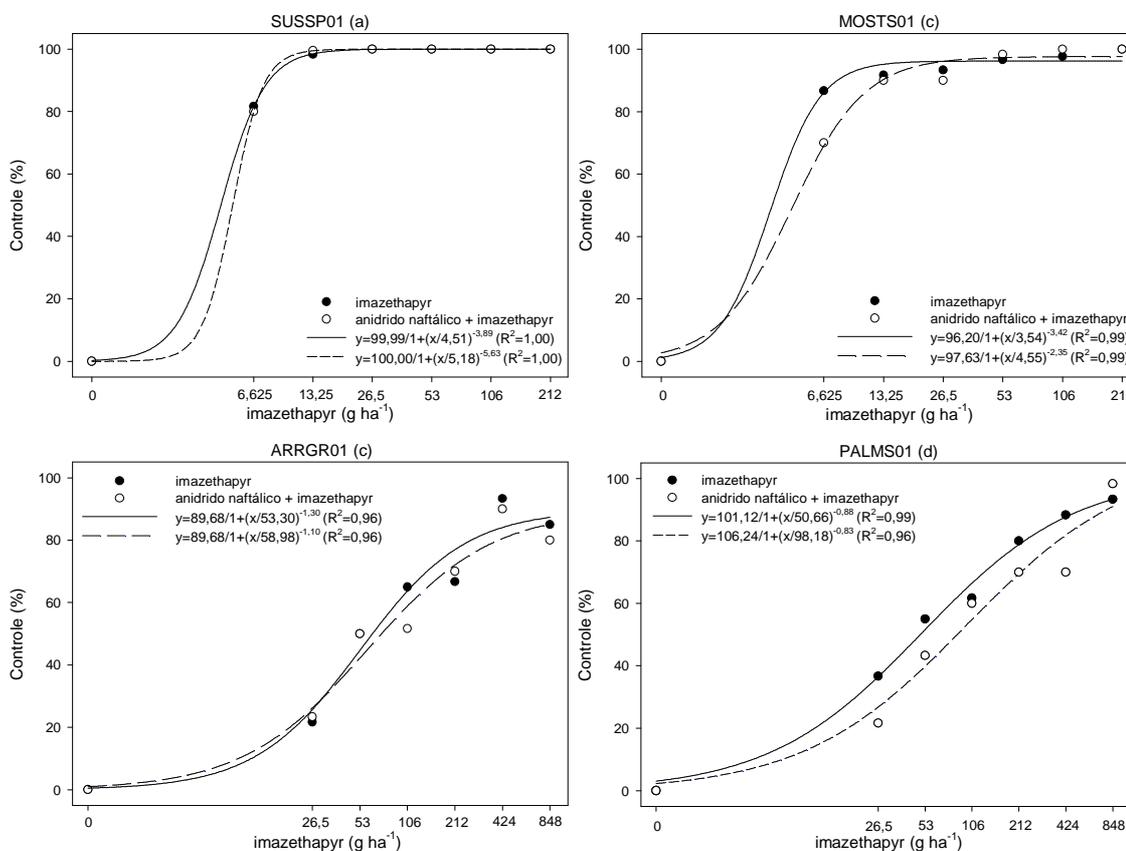


FIGURA 8. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Em relação à variável MMSPA (figura 9), a ANOVA (anexo 2d) demonstra que a interação entre os fatores população e dose de imazethapyr foi significativa, comprovando a diferença de sensibilidade ao herbicida. O efeito do fator principal AN foi significativo, podendo ser observado de maneira mais marcante na população PALMS01 (figura 9d). Observa-se que nas doses de imazethapyr de 26,5; 53 e 106 g ha⁻¹, a aspersão prévia de AN aumentou o acúmulo de MMSPA em aproximadamente 33%, 50% e 63%, respectivamente. O aumento no acúmulo de MMSPA observado

resultou nos aumentos da GR₅₀ (tabela 6) e do FR (tabela 7). Nas plantas que receberam apenas imazethapyr o FR foi de 4,45, ao passo que plantas tratadas previamente com AN tiveram FR de 8,32.

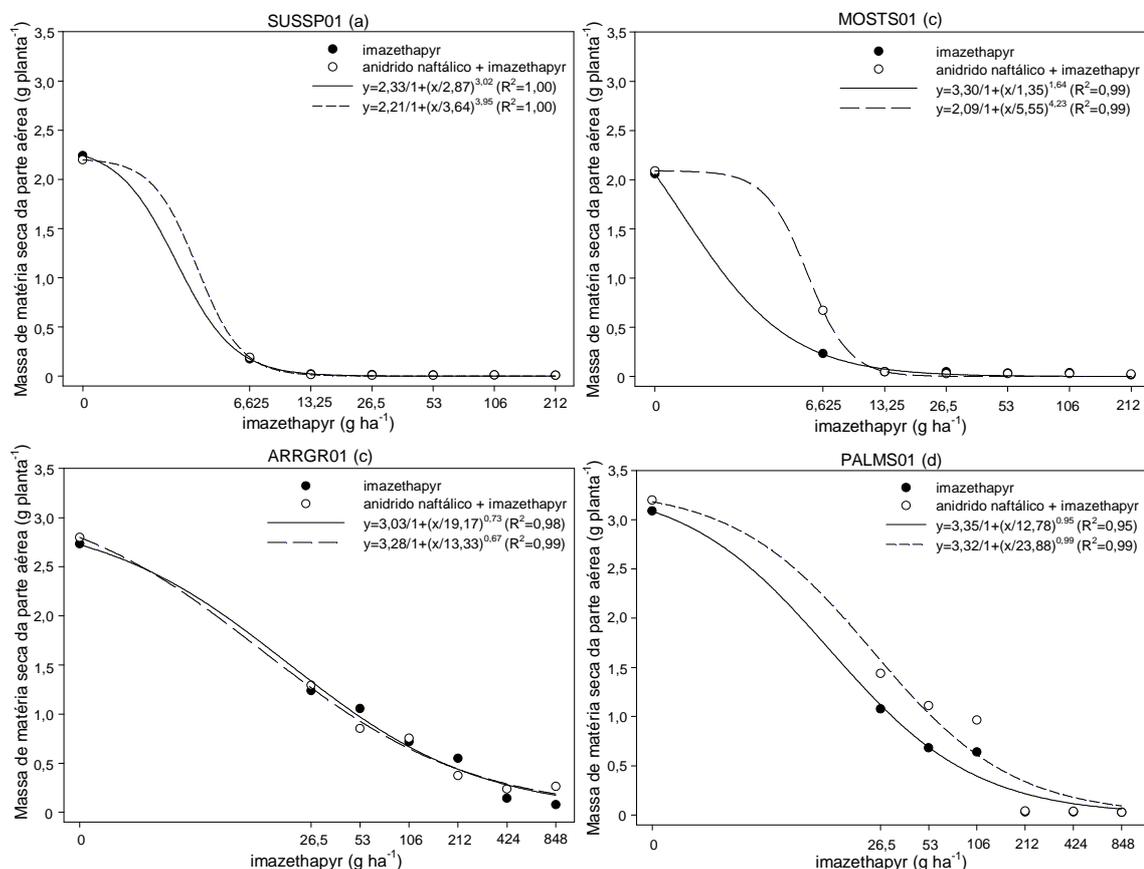


FIGURA 9. Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aspersão prévia de indutor de enzimas P450 (anidrido naftálico), aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos, em duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

A redução na fitointoxicação por imazethapyr em plantas de capim-arroz tratadas previamente com AN demonstra o papel desse composto no incremento da metabolização por enzimas P450. Esse composto é capaz de induzir a expressão de genes P450 e, conseqüentemente, proporcionar maior conteúdo de enzima e maior capacidade detoxificadora. O tratamento de sementes de milho com AN induziu a expressão dos genes *CYP92A1* e *CYP72A5* (Persans *et al.*, 2001). Em plantas de milho

tratadas com AN, a fitointoxicação causada por imazethapyr foi menor, sendo que o conteúdo de enzimas P450 em plantas que receberam AN foi maior em relação às plantas não tratadas (Barrett & Maxon, 1991).

TABELA 5. Parâmetros da equação logística e C_{50} para as variáveis controle de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia anidrido naftálico (AN), aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento		a	b	X_0	C_{50} (g ha ⁻¹)	IC
7 DAT						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	88,37	-1,76	4,85	5,64	± 0,26
	AN + imazethapyr	90,68	-1,03	9,54	11,66	± 1,21
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	81,95	-0,83	9,02	15,47	± 2,54
	AN + imazethapyr	73,9	-0,92	12,25	27,33	± 2,13
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	50,11	-2,06	29,59	577,07	± 0,59
	AN + imazethapyr	47,56	-1,16	25,42	>848	± 0,50
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	72,78	-1,04	46,36	98,73	± 5,75
	AN + imazethapyr	46,73	-2,13	31,51	>848	± 1,70
14 DAT						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	98,26	-2,09	4,55	4,63	± 0,17
	AN + imazethapyr	96,08	-2,00	4,06	4,23	± 0,32
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	92,82	-3,24	3,35	3,51	± 0,56
	AN + imazethapyr	92,43	-2,20	4,18	4,50	± 0,32
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	86,54	-1,36	52,54	66,17	± 4,73
	AN + imazethapyr	80,25	-1,09	36,75	58,27	± 2,74
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	94,83	-0,91	34,15	38,50	± 1,72
	AN + imazethapyr	102,68	-0,78	139,93	130,87	± 3,15
21 DAT						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	99,99	-3,69	4,51	4,51	± 0,03
	AN + imazethapyr	100	-5,63	5,18	5,18	± 0,00
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	96,2	-3,42	3,54	3,62	± 0,32
	AN + imazethapyr	97,63	-2,35	4,55	4,64	± 0,21
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	89,68	-1,30	53,3	63,67	± 5,04
	AN + imazethapyr	89,68	-1,10	58,98	72,77	± 7,62
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	101,12	-0,88	50,66	49,40	± 3,60
	AN + imazethapyr	106,24	-0,83	98,18	85,21	± 3,01

C_{50} : dose que causa 50% de controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro X_0 ($\alpha=0,05$).

TABELA 6. Parâmetros da equação logística e GR_{50} para a variável massa de material seca da parte aérea (MMSPA) de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico (AN). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento		a	b	X_0	GR_{50}	IC
MMSPA						
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	2,33	3,02	2,87	2,87	± 0,21
	AN + imazethapyr	2,21	3,95	3,64	3,64	± 0,17
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	3,3	1,64	1,35	1,35	± 0,50
	AN + imazethapyr	5,55	4,23	5,55	5,55	± 0,08
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	3,03	0,73	19,17	19,17	± 2,88
	AN + imazethapyr	3,28	0,67	13,33	13,33	± 1,99
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	3,35	0,95	12,78	12,78	± 2,44
	AN + imazethapyr	3,32	0,99	23,88	23,88	± 3,69

GR_{50} : dose que causa redução de 50% no crescimento das plantas; IC: intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

TABELA 7. Fator de resistência de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr em resposta à aplicação prévia de anidrido naftálico (AN) para as variáveis controle aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), tendo como população suscetível a SUSSP01. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento		Fator de resistência (FR)			
		7 DAT	14 DAT	21 DAT	MMSPA
SUSSP01 (suscetível)	Imazethapyr	1,00	1,00	1,00	1,00
	AN + imazethapyr	2,07	0,91	1,15	1,27
MOSTS01 (suscetível)	Imazethapyr	2,74	0,76	0,80	0,47
	AN + imazethapyr	4,85	0,97	1,03	1,93
ARRGR01 (resistente)	Imazethapyr	102,37	14,30	14,12	4,68
	AN + imazethapyr	>150,35	12,59	16,14	4,64
PALMS01 (resistente)	Imazethapyr	17,51	8,32	10,95	4,45
	AN + imazethapyr	>150,35	28,28	18,89	8,32

3.3.3 Experimento 3- Quantificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz em resposta à aspersão prévia de malathion e anidrido naftálico.

Os resultados obtidos neste experimento corroboram com o efeito do inibidor de enzimas P450 malathion na detoxificação de imazethapyr em plantas resistentes, observado no experimento 1. Conforme esperado, concentrações maiores de imazethapyr foram quantificadas em plantas suscetíveis (SUSSP01), uma vez que essas

plantas possuem menor capacidade de metabolizar o herbicida. No entanto, plantas resistentes (PALMS01) tratadas previamente com o inibidor de P450 malathion apresentaram a mesma concentração de imazethapyr que a encontrada nas plantas suscetíveis, indicando que o malathion inibiu a atividade das enzimas P450 (figura 10).

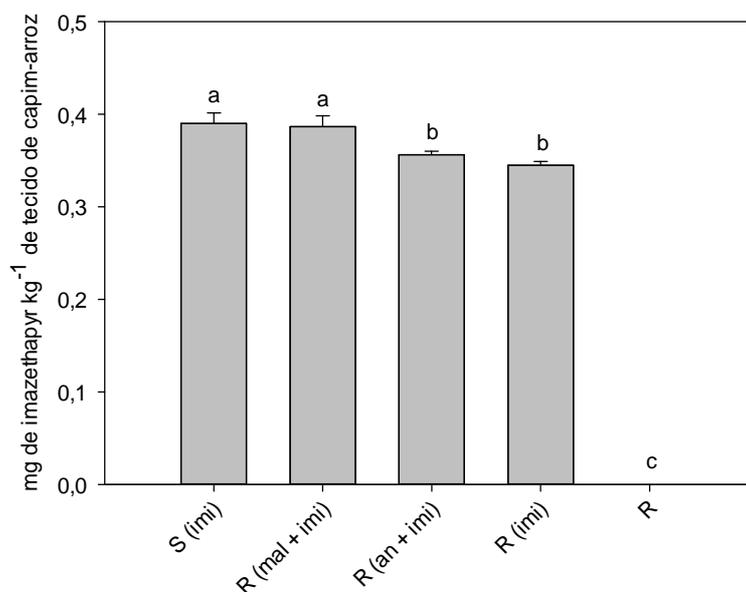


FIGURA 10. Efeito da aplicação prévia de malathion e anidrido naftálico sobre a concentração de imazethapyr (mg kg^{-1} de tecido) em folhas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). S: suscetível (SUSSP01); R: resistente (PALMS01); imi: imazethapyr (106 g ha^{-1}); mal: malathion (1000 g ha^{-1} , duas horas antes da aplicação de imazethapyr); an: anidrido naftálico (1000 g ha^{-1} , duas horas antes da aplicação de imazethapyr); letras indicam o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Plantas resistentes tratadas apenas com imazethapyr apresentaram menor concentração do herbicida em comparação com plantas suscetíveis tratadas com e imazethapyr e resistentes que receberam malathion seguido de imazethapyr. Esses resultados demonstram que plantas resistentes, quando tratadas previamente com malathion, comportam-se como suscetíveis, uma vez que a concentração de imazethapyr sete dias após a aspersão dos tratamentos foi igual. A aplicação prévia de AN não apresentou efeito como indutor de enzimas P450.

3.3.4 Experimento 4- Mistura simultânea de imazethapyr com diferentes doses de malathion no controle de capim-arroz resistente a imidazolinonas

A ANOVA referente ao controle aos 7 DAT demonstra ter ocorrido interação significativa entre o fator população de capim-arroz e a dose de malathion em associação com a dose recomendada de imazethapyr (figura 11a) (anexo 4a). Não foi observado incremento expressivo no controle efetuado pelo herbicida imazethapyr através da adição simultânea de malathion, independentemente da dose do inibidor utilizada. Mesmo em doses muito altas de malathion ($7,59 \text{ kg ha}^{-1}$), o incremento no controle foi de no máximo 8,5%. Assim como nos demais experimentos, a população PALMS01 mostrou-se mais sensível ao herbicida imazethapyr, em relação à população ARRGR01.

Aos 14 DAT os resultados de controle foram similares (figura 11b), porém a interação entre os fatores não foi significativa (anexo 4b). Assim como aos 7 DAT, o controle foi maior na população PALMS01, variando de 87,5% a 92,5% nos tratamentos que receberam a dose zero e $7,59 \text{ kg ha}^{-1}$, respectivamente. Na população ARRGR01, o incremento no controle foi de 10%, variando de 50% a 60%.

Os dados de acúmulo de MMSPA (figura 11c) demonstram que, assim como para as variáveis de controle, a mistura de malathion causou redução no crescimento das plantas. Em ambas as populações, a redução no acúmulo de MMSPA foi de aproximadamente 30%, na dose de $7,59 \text{ kg ha}^{-1}$. No entanto, na dose empregada nos demais experimentos ($1,00 \text{ kg ha}^{-1}$), a redução foi de 30% para a população PALMS01 e de apenas 3% para a população ARRGR01, demonstrando a maior tolerância desta população ao herbicida imazethapyr. Dessa forma, este resultado indica que a população

ARRGR01 necessita de doses maiores de malathion para que ocorra a inibição das enzimas P450, assim como foi observado no experimento 1.

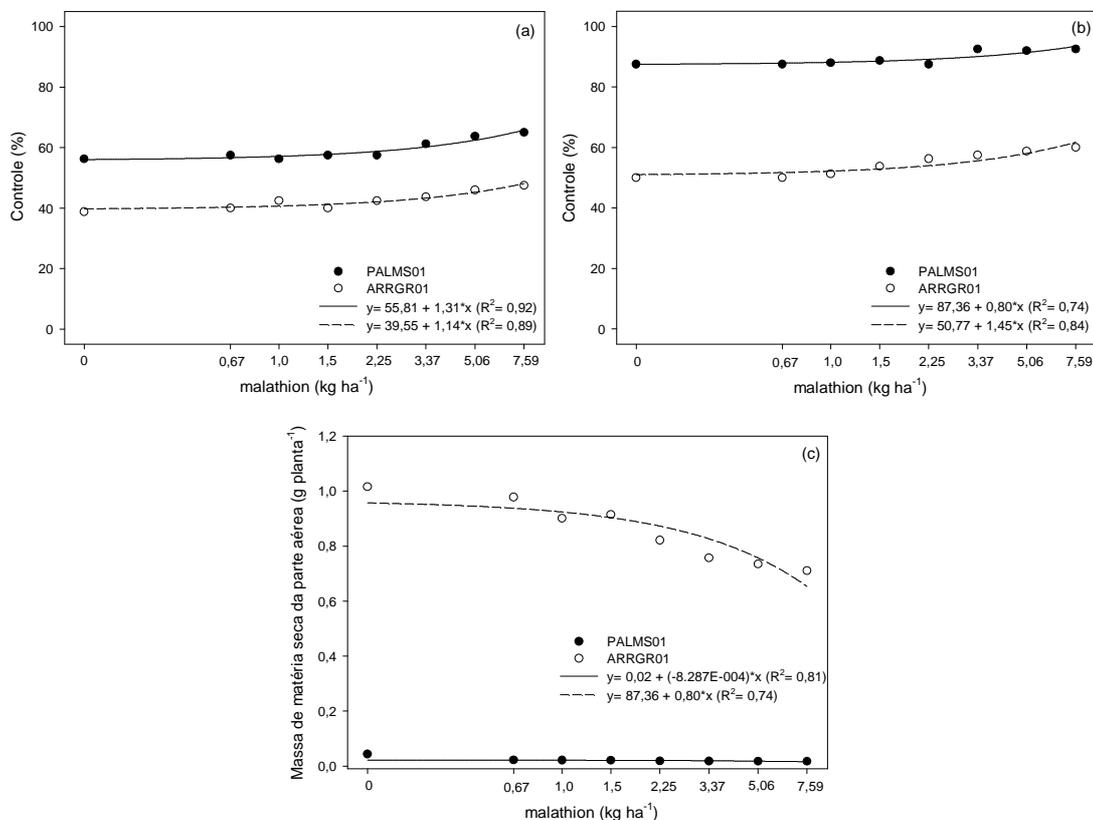


FIGURA 11. Controle (%) aos 7 (a) e 14 (b) dias após a aplicação dos tratamentos e massa de material seca da parte aérea (MMSPA) (c) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr (106 g ha⁻¹) em associação com diferentes doses de malathion. Foram avaliadas duas populações resistentes (ARRGR01 e PALMS01) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Embora tenha ocorrido incremento no controle com a adição de malathion, em nenhum dos tratamentos se obteve 100% de controle. Além disso, considerando o custo deste inseticida organofosforado (aproximadamente R\$60,00 por Kg), a sua utilização em mistura com o herbicida torna-se inviável do ponto de vista econômico, uma vez que outros herbicidas ou métodos mais eficientes e baratos poderiam ser empregados. A utilização deste produto é justificada como forma de conhecimento do mecanismo responsável pela resistência a herbicidas.

A aplicação prévia de malathion proporcionou maiores índices de controle em comparação com a aplicação em mistura com o herbicida imazethapyr. Na população PALMS01, na dose de 106 g ha⁻¹ de herbicida e 1,00 kg ha⁻¹ de malathion, a aplicação prévia (experimento 1) causou redução de 55% no acúmulo de MMSPA. Com a aplicação simultânea (experimento 4), a redução foi de apenas 30%. Alguns trabalhos corroboram com os resultados obtidos nestes estudos, indicando que a aspersão prévia dos inibidores de enzimas P450 é mais eficiente (Yasour *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). A aspersão simultânea de malathion (1,00 kg ha⁻¹) com o herbicida imazethapyr em *E. crus-galli* causou pequena redução no acúmulo de MMSPA em relação às plantas que receberam apenas o herbicida, variando de 5% a 10% (Riar *et al.*, 2012). Possivelmente, a menor resposta observada quando o malathion é aspergido em mistura com o imazethapyr ocorre devido às características físico-químicas destes produtos, juntamente com a composição epicuticular das folhas de capim-arroz. O revestimento epicuticular de folhas de capim-arroz é predominantemente formado por componentes polares (72%) (Kissmann, 1997). Devido ao menor caráter lipofílico do malathion ($K_{ow}= 560$), a sua absorção é mais lenta em relação ao imazethapyr ($K_{ow}= 11$). Dessa forma, a aspersão do inibidor deve ser prévia ao herbicida para que ocorra a absorção e inibição das enzimas P450 de maneira mais eficiente. Embora este procedimento seja comumente utilizado para a detecção de enzimas P450 atuando como detoxificadoras de herbicidas, o mesmo já foi utilizado em formulações sinérgicas de herbicidas, como no caso da mistura de propanil com o organofosforado piperophos (400 g L⁻¹ + 40 g L⁻¹) (Valverde *et al.*, 2007). O coeficiente de lipofilicidade do herbicida propanil ($K_{ow}= 193$) é superior ao do imazethapyr, o que torna a sua absorção mais lenta, possibilitando a inibição das enzimas P450 pelo organofosforado mesmo em situações de aplicação simultânea.

A resistência por incremento de metabolização observada nas populações de capim-arroz utilizadas neste estudo alerta para a ocorrência de resistência múltipla dessa espécie envolvendo mecanismos NRLA. Esse tipo de resistência é particularmente preocupante, uma vez que o seu manejo é dificultado devido à limitação no número de herbicidas. Ao contrário da resistência RLA, a simples mudança de herbicida pode não ser suficiente, demandando o emprego de métodos alternativos de controle.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aspersão prévia de malathion e PBO proporcionou maior controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr, conforme indicado pela redução dos valores de FRs nas populações resistentes. As respostas mais significativas foram observadas para o inibidor de enzimas P450 malathion, principalmente sobre plantas da população PALMS01. De maneira oposta, a aspersão prévia de anidrido naftálico deve ter induzido a atividade de enzimas P450, reduzindo o controle de plantas e aumentando os valores dos FRs nas populações resistentes. A aspersão conjunta de imazethapyr e malathion, mesmo que em altas doses, não promove o controle de plantas de capim-arroz tal qual o obtido com a aspersão prévia do inibidor.

A atividade de enzimas P450 foi inibida em plantas resistentes (PALMS01) com a aspersão prévia de malathion, uma vez que a concentração de imazethapyr em plantas resistentes tratadas com o inibidor foi similar à observada na população resistente (SUSSP01). Esses resultados, de forma conjunta, comprovam indiretamente que o incremento de metabolização por enzimas P450 está envolvido como mecanismo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D. et al. Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. especial, p. 993-1003, 2010.
- BARRETT, M; MAXON, J. M. Naphthalic anhydride induces imazethapyr metabolism and cytochrome P-450 activity in maize. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 46, n. 1, p. 897-900, 1991.
- CARVALHO, S. J. P. et al. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 535-542, 2005.
- CARVALHO, S. J. P. et al. Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 1, p. 136-142, 2009.
- FISCHER, A. J. et al. Mechanisms of resistance to bispyribac-sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 68, n. 3, p. 156-165, 2000.
- HATZIOS, K. K.; BURGOS, N. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 454-467, 2004.
- HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 15 de janeiro de 2016.
- HODGSON, E; LEVI, P. E. Interactions of Piperonyl Butoxide with cytochrome P450. In: JONES, D. G. (Ed.) **Piperonyl Butoxide: the insecticide synergist**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 41-54.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2ª ed. São Bernardo do Campo: Basf, 1999. t.II. 978 p.
- LETOUZE, A.; GASQUEZ, J. Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). **Agronomie**, Versailles, v. 23, n. 7, p. 601-608, 2003.
- LIU, C. et al. Expression of a rice CYP81A6 gene confers tolerance to bentazon and sulfonyleurea herbicides in both *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 3, p. 419-428, 2012.
- PERSANS, M. W. et al. Characterization of maize cytochrome P450 monooxygenases induced in response to safeners and bacterial pathogens. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, n. 2, p. 1126-1138, 2001.
- PINTO, J. J. O. et al. Controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 767-777, 2008.

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

PRESTON, C.; 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**, London, v.88, n. 1, p.8-13, 2002.

RIAR, D. S. et al. Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **International Journal of Agronomy**, [S.l.], v. 2012, n. 1, p. 1-8, 2012.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochemistry Reviews**, New York, v. 5, n. 2, p. 445-458, 2006.

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

VALVERDE, B. E. Status and management of grass-weed herbicide resistance in Latin America. **Weed Technology**, Champaign, v. 21, n. 2, p. 310-323, 2007.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000.

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

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

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicides resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop protection. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 166, n. 3, p. 1106-1118, 2014.

YUAN, J. S.; TRANDEL, P. J.; NEAL, S. J. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

YUN, M. S. et al. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 83, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

4 CAPÍTULO 3- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DETOXIFICAÇÃO DE IMAZETHAPYR EM PLANTAS DE CAPIM-ARROZ

RESUMO

A elucidação do mecanismo de resistência de plantas daninhas a herbicidas é importante para que práticas adequadas de manejo sejam empregadas. O objetivo deste estudo foi identificar e analisar a expressão de genes relacionados à detoxificação de imazethapyr em plantas de capim-arroz. Foram avaliadas três populações de capim-arroz, sendo uma suscetível (SUSSP01) e duas resistentes (ARRGR01 e PALMS01). Estudos prévios com as populações resistentes indicaram que não existem mutações no gene *ALS* relacionadas com a resistência, e inibidores de metabolização reverteram o fator de resistência ao herbicida imazethapyr. Os tratamentos constaram da ausência ou aplicação do herbicida imazethapyr na dose de 106 g ha⁻¹. As plantas foram coletadas antes e 24 h após a aplicação do herbicida. A análise de estabilidade de genes referência foi realizada utilizando-se sete genes referência, na qual os genes *18S* e *actina* apresentaram-se mais estáveis em resposta à população e ao estresse causado pelo herbicida. Foram avaliadas a expressão de sete genes *CYP*, três *GST*, um fator iniciador de tradução (*eIF4B*), além do gene *ALS*. A análise de expressão gênica foi realizada por meio de reação de qRT-PCR. Não foi observada diferença na expressão relativa do gene *ALS* entre as populações suscetíveis e resistentes, tratadas ou não tratadas com imazethapyr. Os genes *CYP81A6* e *GSTF1* apresentaram maior expressão relativa nas populações resistentes. O gene *CYP81A6* apresentou expressão 9,61 e 8,44 vezes superior nas populações resistentes ARRGR01 e PALMS01, respectivamente em relação à população suscetível SUSSP01 não tratada. A expressão desse gene foi induzida pela aspersão do herbicida imazethapyr. O gene *GSTF1* apresentou maior expressão relativa na população PALMS01, chegando a 12,30 vezes superior nas plantas tratadas com imazethapyr em relação à população suscetível SUSSP01 não tratada. Além desses genes, foi observada a maior expressão do fator iniciador de tradução *eIF4B* nas populações resistentes, o qual para as populações ARRGR01 e PALMS01 tratadas com imazethapyr apresentou expressão 6,46 e 5,96 superior, respectivamente, em comparação com a população suscetível. A maior expressão relativa dos genes *CYP81A6* e *GSTF1* confirma o incremento de metabolização como mecanismo de resistência a imazethapyr em capim arroz.

CHAPTER 3- ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO IMAZETHAPYR DETOXIFICATION IN BARNYARDGRASS PLANTS

ABSTRACT

The understanding of mechanism of herbicide resistance in weeds is essential for the design and utilization of correct weed management practices. The aim of this study was to identify and analyze the expression of genes related to detoxification of imazethapyr in barnyardgrass. The study was carried out using one susceptible (SUSSP01) and two populations resistant to imazethapyr (ARRGR01 and PALMS01). Previous studies with the resistant populations indicated absence of *ALS* gene mutation associated with herbicide resistance and decreasing of the resistance level in response to metabolism inhibitors. Plant material was collected before and 24 h after spraying of imazethapyr at 106 g ha⁻¹. A reference gene stability analysis was carried out using seven reference genes, wherein the genes *18S* and *actin* showed to be more stable in response to the population and herbicide treatment. The study consisted of the evaluation of seven genes *CYP*, three *GST* genes, the translation initiating factor (*eIF4B*), and the *ALS* gene. The gene expression analysis was performed by qRT-PCR. There was no difference in the relative expression of the *ALS* gene between susceptible and resistant populations, treated or not treated with imazethapyr. The *CYP8IA6* and *GSTF1* genes showed higher relative expression in the resistant populations. The *CYP8IA6* gene had expression 9.61 and 8.44 higher in the resistant populations ARRGR01 and PALMS01, respectively, in comparison with the susceptible population SUSSP01 untreated. The expression of this gene was induced by spraying the herbicide imazethapyr. The *GSTF1* gene showed higher relative expression in PALMS01 population, reaching 12.30 times higher in plants treated with imazethapyr in relation to susceptible population SUSSP01 untreated. The expression of the *eIF4B* translation initiator factor for the resistant populations ARRGR01 and PALMS01 treated with imazethapyr was 6.46 and 5.96 higher, respectively, compared with the susceptible population. The high relative expression of *CYP8IA6* genes and *GSTF1* indicate the importance of degradation enhancement for the resistance of barnyardgrass to imazethapyr.

4.1 INTRODUÇÃO

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas está relacionada à ocorrência de dois mecanismos primários de resistência: a resistência relacionada ao local de ação do herbicida (RLA) e a não relacionada ao local de ação do herbicida (NRLA) (Powles & Yu, 2010). O mecanismo de resistência RLA pode ser causado por mutação no gene que codifica a enzima alvo, maior atividade da enzima alvo ou aumento no número de cópias no gene que codifica a enzima alvo. Os mecanismos NRLA abrangem a resistência causada pela menor absorção e aumento ou diminuição da translocação do herbicida, sequestro do herbicida no vacúolo e incremento de detoxificação do herbicida (Yu & Powles, 2014).

O incremento de detoxificação de herbicidas por enzimas detoxificadoras tem sido relacionado à resistência em várias espécies de plantas daninhas, principalmente as poáceas *Lolium rigidum* (Yu *et al.*, 2009; Busi *et al.*, 2011), *Alopercurus myosuroides* (Délye *et al.*, 2011) e *Echinochloa phyllopogon* (Yasour *et al.*, 2009; Iwakami *et al.*, 2014a). Entre as enzimas detoxificadoras, destacam-se as enzimas citocromo P450 monoxigenases (conhecidas como CYP ou P450) e as enzimas glutatona S-transferases (GST). As enzimas P450 e GST são fundamentais nas fases I e II do metabolismo de herbicidas, respectivamente (Yuan *et al.*, 2007). A resistência devido ao incremento de metabolização é particularmente preocupante, uma vez que uma mesma enzima pode detoxificar mais de um herbicida, levando à resistência cruzada ou múltipla (Beckie & Tardif, 2012).

O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz-irrigado (Agostinetto *et al.*, 2010), podendo causar reduções de produtividade na ordem de 90% (Pinto *et al.*, 2008). O sistema de produção de arroz

resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas (arroz Clearfield[®]), aumentou a utilização repetida desses herbicidas, selecionando populações de capim-arroz resistentes (Wilson *et al.*, 2010). O mecanismo de resistência dessas populações envolve tanto mutações no gene *ALS* quanto o incremento de metabolização por enzimas detoxificadoras (Matzenbacher *et al.*, 2015).

O envolvimento de genes *CYP* e *GST* já foi descrito em processos de resistência em plantas daninhas e seletividade em plantas cultivadas. A família de genes *CYP81A* está estreitamente relacionada com a metabolização de herbicidas em plantas. O gene *CYP81A6* já foi relacionado à metabolização de bensulfuron-methyl e sulfoniuréias em arroz (Pan *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012). Em *Echinochloa phyllopogon*, as maiores expressões dos genes *CYP81A12* e *CYP81A21* estão associadas à resistência à penoxulam e bensulfuron-methyl (Iwakami *et al.*, 2014a). Nesta mesma espécie, a aspersão prévia de bispyribac-sodium induziu a expressão dos genes *CYP71AK2* e *CYP72A254* em plantas resistentes aos inibidores da ALS (Iwakami *et al.*, 2014b). Em arroz e *Arabidopsis thaliana*, o gene *CYP72A31* confere tolerância ao herbicida bispyribac-sodium (Saika *et al.*, 2014). Em relação aos genes *GST*, o gene *GSTF1* conferiu maior tolerância aos herbicidas chlorotoluron e fenoxaprop-p-ethyl em *Alopercurus myosuroides* e *Lolium rigidum*, causando resistência múltipla (Cummins *et al.*, 2013). Em arroz, a superexpressão dos genes *GSTL1* ou *GSTL2* levou à maior tolerância aos herbicidas chlorsulfuron e glyphosate (Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014). Da mesma forma, a maior expressão do gene *GSTI* foi descrita como a causa da resistência de plantas de *E. crus-galli* ao herbicida quinclorac (Li *et al.*, 2013). Embora as enzimas GST catalisem reações de conjugação do herbicida com moléculas mais solúveis, diminuindo a fitotoxicidade dos compostos (Yuan *et al.*, 2007), essas enzimas

também apresentar outras funções na detoxificação de herbicidas, tais como a atividade peroxidase e a sinalização de estresses (Dixon *et al.*, 2002; Powles & Yu, 2010; Cummins *et al.*, 2013).

Em reações de qRT-PCR (do inglês, *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*), faz-se necessária a análise da estabilidade de genes referência, utilizados no cálculo da expressão relativa do gene alvo. Uma série de estudos demonstra que a expressão dos genes referência amplamente utilizados nesse tipo de estudo pode variar consideravelmente com as condições experimentais, tecidos e espécies (Thellin *et al.*, 1999; Stürzenbaum & Kille, 2001). A análise da estabilidade na expressão de genes referência em plantas daninhas em resposta ao estresse por herbicidas já foi realizada em *A. myosuroides* para os herbicidas inibidores da enzima ACCase (Petit *et al.*, 2012) e em *L. rigidum* para herbicidas inibidores da enzima ALS (Duhoux & Délye, 2013). Nesses estudos, o gene referência mais estável para *A. myosuroides* e *L. rigidum* foram os genes que codificam para as proteínas tubulina e CAP, respectivamente. Em capim-arroz (*E. crus-galli*) sob estresse por herbicidas, a estabilidade de genes referência ainda não foi investigada.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a estabilidade de genes referência e a expressão de genes *CYP* e *GST* em plantas de capim-arroz suscetíveis e resistentes às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Produção do material vegetal

Foram utilizadas uma população suscetível e duas populações resistentes ao herbicida imazethapyr. A origem da população suscetível foi São Paulo-SP (SUSSP01)

e as populações resistentes foram oriundas de Arroio Grande-RS (ARRGR01) e Palmares do Sul-RS (PALMS01).

A superação da dormência das sementes para todos os experimentos foi realizada por meio da imersão das sementes em solução de KNO_3 (0,2%), em temperatura de 25°C, até o início da germinação (emissão da radícula), o que ocorreu, aproximadamente, quatro dias após a imersão. Após, as sementes foram enxaguadas em água destilada e acondicionadas em placas de Petri em BOD (temperatura de 25°C) até a emissão da primeira folha para que, em seguida, fossem transplantadas em vasos de 200 mL.

Como substrato foi utilizada a mistura de argissolo e composto orgânico, na proporção de 10:1, além da complementação com fertilizante mineral. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação climatizada, com temperatura de 25-27°C, umidade relativa do ar de aproximadamente 70% e fotoperíodo de 14/10 horas (dia/noite).

4.2.2 Aspersão do herbicida

O herbicida imazethapyr foi aspergido na dose recomendada, de 106 g ha⁻¹, acrescido de adjuvante (Dash 0,5% v/v). A aspersão do herbicida foi realizada quando as plantas se encontravam com 3-4 folhas em câmara de pulverização automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), utilizando-se ponta de pulverização TJ8002E, com pressão constante de 42 lb pol⁻² e velocidade de deslocamento de 1,16 m s⁻¹, gerando o volume de calda de 200 L ha⁻¹.

4.2.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em dois diferentes tempos de coleta: T0 (antes da aspersão do herbicida e T24 (24 horas após a aspersão do herbicida). Em cada tempo

foram coletadas três repetições biológicas, sendo que cada uma delas foi formada por folhas de diferentes plantas. Cada amostra foi coletada, armazenada em microtubo de 1,5 mL e imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido (LN₂). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em ultrafreezer (-85°C), até o momento da extração do mRNA.

4.2.4 Extração do RNA

O RNA foi extraído por meio da maceração de 0,1 g de amostra de material vegetal em nitrogênio líquido (LN₂) e adição de 300 µL do reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas (dois vortex por 15 s) e centrifugadas a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e incubado durante 5 min em temperatura ambiente. Após, em cada tubo foram adicionadas 60 µL de clorofórmio e agitados vigorosamente no vortex durante 15 s. Em seguida, os tubos foram incubados em temperatura ambiente durante 5 min e centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionada solução precipitadora de RNA (0,8 M citrato de sódio e 1,2 M NaCl) e isopropanol na quantidade correspondente a metade do volume da fase aquosa transferida para o novo tubo. Posteriormente, os tubos foram invertidos para misturar a solução, e incubados durante 10 min em temperatura ambiente e centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante oriundo do processo de centrifugação foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% e centrifugado a 8000 rpm durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet permaneceu durante 10 min em estufa com circulação de ar seco a 30°C, para secagem. Por fim, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase, incubado durante 10 min a

60°C, centrifugado a 8000 rpm durante 5 min a 4°C para precipitar o material insolúvel e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

A concentração de RNA extraído foi verificada utilizando-se espectrofotômetro Genesys 2[®] (Thermo Spectronic), em comprimento de onda de 260 nm. Para isso, 3 µL de solução de RNA foram diluídos em 297 µL de água Milli-Q.

4.2.5 Purificação do RNA e Síntese do cDNA

A purificação das amostras de RNA foi realizada em 1 µg de RNA total, ajustando-se o volume necessário para se obter essa quantidade. A esse volume foi adicionado 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 1 µL de DNase e o volume necessário de água RNase free para completar o volume total de 10 µL. As amostras foram incubadas durante 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, em cada amostra foi adicionado 11 µL de EDTA (25 mM), seguido da incubação por 10 min em temperatura de 65°C. As amostras foram mantidas em gelo por 1 min, seguido de um *spin* de 5 s.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada por meio da adição de 1 µL de Mix primers- oligo (dT) (50 µM), 1 µL de 10 mM dNTP Mix e 1 µL de água RNase free às amostras de RNA total purificado, obtendo-se o volume final de 20 µL por amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 5 min a 65°C (termociclador) e encubadas em gelo por 1 min. Após realizado um breve *spin*, em cada amostra foram adicionados 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1 M) e 0,4 µL de SuperScript III RT (200 unidades µL⁻¹). As amostras foram suavemente misturadas e incubadas por 5 min a 25°C. Em seguida, as amostras foram incubadas a 50°C por 60 min, seguido de uma etapa de 15 min a 70°C para inativação da reação.

4.2.6 Genes candidatos e desenho dos primers

Os genes referência avaliados quanto à sua estabilidade, assim como os *primers*, estão listados na tabela 1. Esses genes foram selecionados a partir do trabalho realizado por Duhoux & Délye (2013). Os genes candidatos *CYP* e *GST* foram escolhidos baseando-se em uma ampla revisão de literatura (tabela 2). Além desses genes, foi avaliada a expressão do gene *ALS* (local de ação do herbicida imazethapyr) e do fator iniciador de tradução *eIF4B* (tabela 2).

TABELA 1. Relação dos genes referência e sequências dos *primers* dos sete genes referência utilizados para a análise de RT-PCR em tempo real. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (<i>forward</i>)	Sequência do <i>primer</i> (<i>reverse</i>)
<i>Actina</i>	5'-tttccaagggtgagtatgatgag-3'	5'-acacaggacacaaaagccaacta-3'
<i>CAP</i>	5'-ctccagggaagatgctgaag-3'	5'-cttgaaagcccaatcaaaa-3'
<i>EF1</i>	5'-cactggtcacctgatctacaa-3'	5'-gtacttgaaggacctctgttca-3'
<i>Rubisco</i>	5'-ggagtatgaaaccaaggatactg-3'	5'-gttgccatgtaccagtagaaga-3'
<i>Ubiquitina</i>	5'-caagaagaagacgtacaccaag-3'	5'-gacctttagaactggaggag-3'
<i>18S</i>	5'-gtgacggagaattagggttc-3'	5'-tgtcaggattgggtaatttg-3'
<i>28S</i>	5'-ctgatcttctgtgaagggt-3'	5'-tgatagaactgctaattgggc-3'

18S: RNA ribossomal 18S; Act: actina; Ubi: ubiquitina; 28S: RNA ribossomal 28S; EF1: fator de alongação 1; CAP: ativador catabólico de proteína; Rub: Rubisco.

Algumas sequências de *primers* foram obtidas diretamente na literatura. As demais sequências foram desenhadas a partir do programa Primer3Plus (<<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>>) a partir da região mais conservada de cada sequência obtida no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para cada gene foram desenhados três pares de *primers*. A seleção da sequência nucleotídica dos *primers* baseou-se em temperatura de pareamento de 60°C, tamanho próximo a 20 pb e tamanho de fragmento esperado em torno de 100 pb.

TABELA 2. Relação dos genes *CYP* e *GST* e sequências dos *primers* utilizados para a análise de RT-PCR em tempo real. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (<i>forward</i>)	Sequência do <i>primer</i> (<i>reverse</i>)
<i>CYP81A6</i>	5'-gaagcccaggagtttaagca-3'	5'-ggcgatcatgctcttcttct-3'
	5'-gaagcccaggagtttaagca-3'	5'-ttctgcagagtgagcagcac-3'
	5'-gccaacctgtgggactactt-3'	5'-tacacctccggctctgtctt-3'
	5'-tgtcgctactgctgaaccacccc-3'	5'-ttcagtcatgtcgacctccacgc-3'
<i>CYP81A12</i>	5'-aatcacaccgcttctctgttc-3'	5'-aacgttctcatcttaataactcatacc-3'
<i>CYP81A21</i>	5'-ccaagctgcgatcaatcattc-3'	5'-taatcgttcatacaaaccagtagtagt-3'
<i>CYP71C30</i>	5'-cttctacggcaacgacttcc-3'	5'-caaacgcctccgtcatatct-3'
	5'-acgctcaccttcgagatcat-3'	5'-cggttgacagcaatacaaaaga-3'
	5'-gctcaccttcgagatcatcc-3'	5'-cggttgacagcaatacaaaaga-3'
<i>CYP71AK2</i>	5'-atgacgtatgacttaccacaatg-3'	5'-cgatccacgacacttcaaaac-3'
<i>CYP72A254</i>	5'-accaaccagccatcaggt-3'	5'-caaatagcgccactcaaaaac-3'
<i>CYP72A31</i>	5'-gaagaacaaacctgactacgaaggct-3'	5'-ctccatctctttgtatgtttccgaccaat-3'
<i>GSTF1</i>	5'-caagtacgtcctccgaagt-3'	5'-ggggtgaagaggcattggta-3'
	5'-acgtcctccgcaagtacaag-3'	5'-ggggtgaagaggcattggta-3'
	5'-tggggatctgcttctctttg-3'	5'-ggggtgaagaggcattggta-3'
<i>GSTI</i>	5'-gccgaggaggacctgaagaac-3'	5'-gtgactcacagataggcttaccgt-3'
<i>GSTL1</i>	5'-cgcttggattatcaggaact-3'	5'-gctttggagattaagggtga-3'
<i>eIF4B1</i>	5'-aaggggaaagattggaggaa-3'	5'-gaggcttggtcagaaccatc-3'
	5'-aaggggaaagattggaggaa-3'	5'-ggcttggtcagaaccatcac-3'
	5'-gggaagtgttttcaggag-3'	5'-gaggcttggtcagaaccatc-3'
<i>ALS</i>	5'-tggcagcttctcatgaacat-3'	5'-atccccaggtgttggtgttt-3'

4.2.7 Análise em qRT-PCR

O cDNA obtido foi amplificado por PCR em tempo real (RT-PCR) usando-se o kit SYBR Green®. A análise de RT-PCR foi realizada com o equipamento 7300 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços PCR-96M2-HS-C® (Axygen) com selador MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems).

As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, formado por 10 µL da amostra de cDNA (diluída 1:100) em água Mili-Q e 10 µL dos constituintes da reação

composta de 2 μL tampão 10X, 0,5 μL dNTPs (10 μM de cada nucleotídeo), 1,2 μL de solução de MgCl_2 (50 mM), 2 μL de SYBR Green® (Invitrogen) diluído 1:100 (preparado no momento da utilização a partir de solução diluída 100X), 0,2 μL de ROX Reference Dye, 0,1 μL Taq Platinum® (Invitrogen) e 0,4 μL da combinação de *primers forward e reverse*.

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C durante 5 min, seguido de uma sequência de 40 ciclos: iniciado com 94°C por 15 s, 60°C por 10 s, 72°C por 15 s e 60°C por 35 s, e um ciclo final de desnaturação de 95°C por 15 s, 60°C por 60 s, 95°C por 15 s e 60°C por 15 s.

4.2.8 *Análise da estabilidade dos genes referência*

A análise da estabilidade dos genes referência foi realizada a partir dos valores de Ct obtidos na reação de qRT-PCR (Wang *et al.*, 2015). Para isso, foi utilizado o programa computacional RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?ckattempt=1>), o qual utiliza os algoritmos geNorm, Normfinder, BestKeeper e método Ct. Os coeficientes de estabilidade (CE) foram classificados em cada um dos algoritmos e, por fim, foi determinada uma classificação abrangente de todos os algoritmos. Quanto menor o CE, maior a estabilidade do gene referência.

4.2.9 *Análise da expressão gênica*

A partir dos valores de Ct foram calculados a média, o desvio padrão e o intervalo de confiança por tratamento. A quantificação relativa foi realizado pelo ajuste das curvas pela análise da eficiência da PCR através do software LinRegPCR (versão 12.2), que analisa a curva exponencial de amplificação. Valores de $R > 0,99$,

com eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos (Tuomi *et al.*, 2010).

O cálculo de expressão relativa foi realizado através do método ΔCt (Dussault; Pouliot, 2006), pela equação $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{regulador}}) - (Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{\text{regulador}})$, sendo o $\Delta\Delta Ct$ a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação. O valor de $Ct_{\text{regulador}}$ foi determinado pela média dos genes referência que apresentaram menores coeficientes na análise de estabilidade realizada no programa computacional RefFinder.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Especificidade dos primers dos genes reguladores

A especificidade dos *primers* pode ser visualizada na figura 1. Os produtos da reação de qRT-PCR indicam que cada *primer* apresentou um único pico na curva de dissociação, indicado pela temperatura. Isso significa que a amplificação foi específica, não havendo a amplificação de outros genes para determinado *primer* relativo ao gene referência.

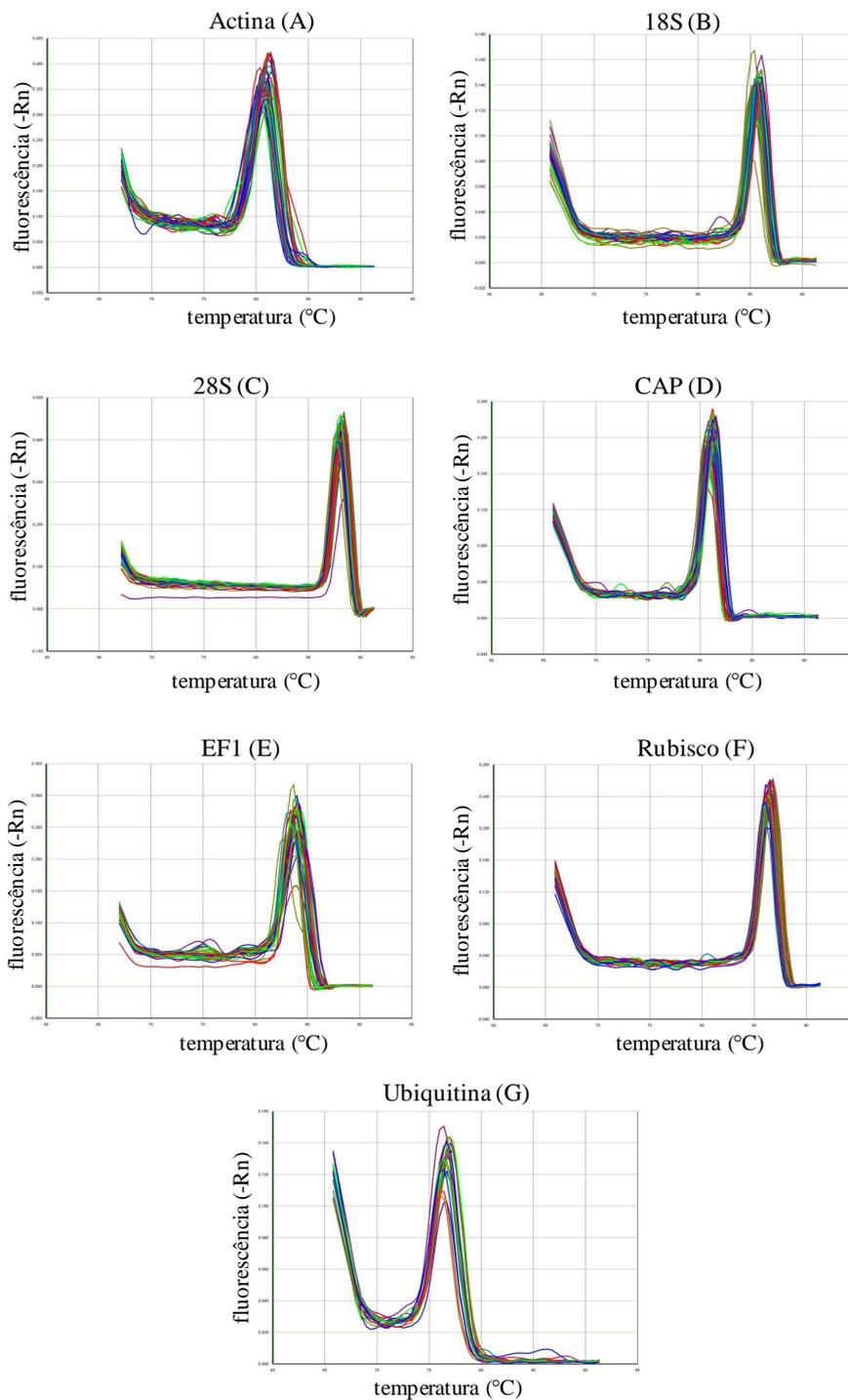


FIGURA 1. Curvas de dissociação de sete genes referência em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis e resistentes às imidazolinonas, em resposta ao estresse pela aspersão de imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

4.3.2 Nível de expressão dos genes referência

Os níveis de expressão dos sete genes referência em todas as amostras (população x herbicida x tempo de coleta) pelas reações de qRT-PCR, representados pelos valores de Ct, são apresentados na figura 2. Quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade de transcritos de determinado gene. Os valores médios de Ct para os sete genes referência avaliados variaram de 23,35 a 32,75. O gene com maior quantidade de transcritos foi o *Rubisco*, seguido pelo *18S*, *28S*, *EF1*, *Actina*, *CAP* e *Ubiquitina*.

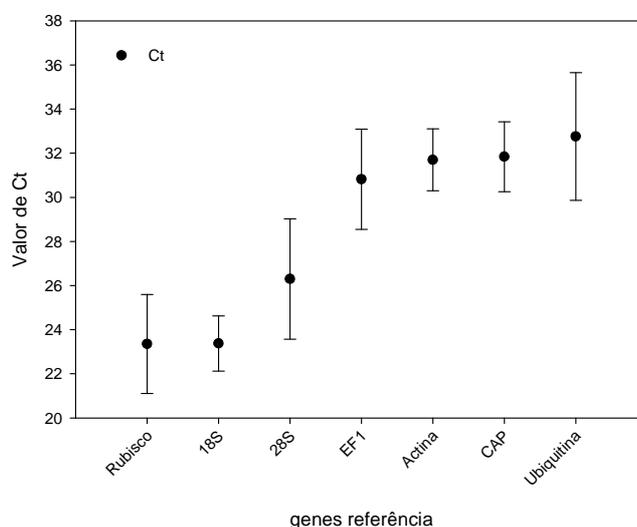


FIGURA 2. Valores de Ct de sete genes referência em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis e resistentes às imidazolinonas, em resposta ao estresse pela aspersão de imazethapyr (barras verticais indicam o desvio padrão no Ct de cada gene). Dados obtidos de 12 repetições biológicas. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

4.3.3 Análise de estabilidade de genes referência

Para a determinação da estabilidade dos genes referência foram utilizados cinco métodos (algoritmos). O método Delta Ct determina a estabilidade dos genes de acordo com a variação do valor do Ct. Dessa forma, os genes mais estáveis são os que apresentaram menor variabilidade nos valores de Ct (Silver *et al.*, 2006). No método geNorm o coeficiente de estabilidade é chamado de “valor M”. O valor M é calculado de acordo com a variação do Ct, no entanto, um novo valor M é recalculado

eliminando-se os dois genes menos estáveis na primeira rodada do cálculo. Quanto menor o valor M, maior a estabilidade do gene referência (Vandesompele *et al.*, 2002). O método NormFinder calcula o coeficiente de estabilidade S e o desvio padrão (DP). Os genes referência são consideráveis estáveis quando ambos os valores S e DP são baixos (Andersen *et al.*, 2004). No método BestKeeper a variação dos valores de Ct e o desvio padrão (DP) de cada gene são utilizados para o cálculo da estabilidade. Genes com $DP < 1$ são considerados estáveis e ordenados com base na correlação entre o valor Ct e a média geométrica dos valores de Ct de todos os valores com $DP < 1$ (índice BestKeeper). Os genes candidatos com maior correlação com o índice BestKeeper são considerados os mais estáveis (Pfaffl *et al.*, 2004). Por fim, o método RefFinder utiliza de maneira integrada os demais métodos de análise da estabilidade dos genes, classificando-os de maneira abrangente. Baseado na ordenação de cada um dos outros métodos, o método RefFinder atribui um peso adequado a um gene individual e calculada a média geométrica dos seus pesos para a classificação abrangente dos genes referência candidatos (Xie *et al.*, 2012).

A análise de estabilidade dos genes demonstra não terem ocorrido grandes variações na classificação dos genes quanto à sua estabilidade entre os métodos utilizados (figura 3 e tabela 3). Quanto menor for o coeficiente de estabilidade (CE), maior a estabilidade do gene. Para todos os métodos utilizados, os genes *18S* e *Actina* apresentaram maior estabilidade, e os genes *CAP* e *Rubisco*, a menor estabilidade. No método Delta Ct (figura 3A), a ordem crescente de estabilidade foi *18S* (CE= 5,51), *Actina* (CE= 5,59), *Ubiquitina* (CE= 5,89), *EF1* (CE= 6,37), *28S* (CE= 6,76), *CAP* (CE= 8,97) e *Rubisco* (CE= 10,95). Para o método BestKeeper (figura 3B), o gene mais estável foi *18S* (CE= 0,95), seguido dos genes *Actina* (CE= 1,34), *28S* (CE= 1,99), *Ubiquitina* (CE= 2,30), *EF1* (CE= 2,33), *CAP* (CE= 6,18) e *Rubisco* (CE= 10,57). O

método NormFinder (figura 3C) ordenou como mais estáveis os genes *Actina* (CE= 2,07), *18S* (CE= 2,81), *Ubiquitina* (CE= 3,18), *28S* (CE= 3,74), *EF1* (CE= 4,98), *CAP* (CE= 7,35) e *Rubisco* (CE= 10,14). Por fim, no método geNorm (figura 3D), os genes *18S* e *Actina*, com os mesmos coeficientes de estabilidade (CE= 2,37), foram os mais estáveis, seguidos dos genes *Ubiquitina* (CE= 2,82), *28S* (CE= 3,27), *EF1* (CE= 3,81), *CAP* (CE= 5,58) e *Rubisco* (CE= 7,12).

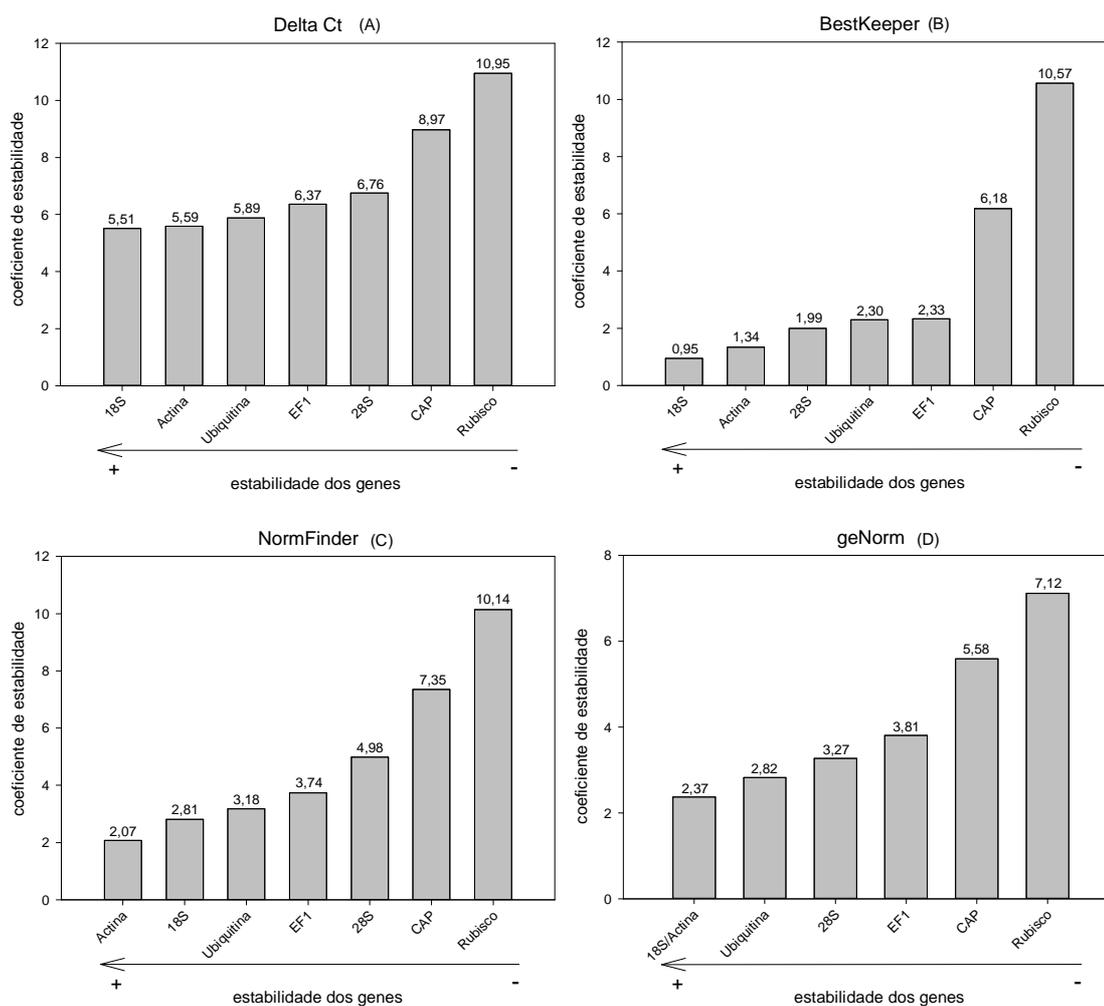


FIGURA 3. Coeficientes de estabilidade de sete genes referência candidatos em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas com imazethapyr, utilizando os programas computacionais Delta Ct (A), BestKeeper (B), NormFinder (C) e geNorm (D). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

TABELA 3. Classificação da estabilidade de sete genes referência em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas com imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Método	Ordem de classificação						
	1	2	3	4	5	6	7
Delta CT	18S	Act	Ubi	EF1	28S	CAP	Rub
BestKeeper	18S	Act	28S	Ubi	EF1	CAP	Rub
NormFinder	Act	18S	Ubi	EF1	28S	CAP	Rub
geNorm	18S/ Act	-	Ubi	28S	EF1	CAP	Rub
RefFinder (classificação abrangente)	18S	Act	Ubi	28S	EF1	CAP	Rub

18S: RNA ribossomal 18S; Act: actina; Ubi: ubiquitina; 28S: RNA ribossomal 28S; EF1: fator de alongação 1; CAP: ativador catabólico de proteína; Rub: Rubisco.

Na ordenação realizada pelo algoritmo RefFinder (figura 4 e tabela 3), o qual faz uma classificação abrangente utilizando os resultados dos outros quatro algoritmos (Delta Ct, BestKeeper, NormFinder e GeNorm), o gene *18S* apresentou maior estabilidade na expressão (CE= 1,19), seguido dos genes *Actina* (CE= 1,41), *Ubiquitina* (CE= 3,22), *28S* (CE= 4,16), *EF1* (CE= 4,47), *CAP* (CE= 6,00) e *Rubisco* (CE= 7,00). Dessa forma, a média de Ct dos genes *18S* e *Actina*, por terem apresentado maior estabilidade no método RefFinder, foram os utilizados para o cálculo da expressão relativa dos genes *CYP* e *GST*, além do gene *ALS* e do fator iniciador de tradução

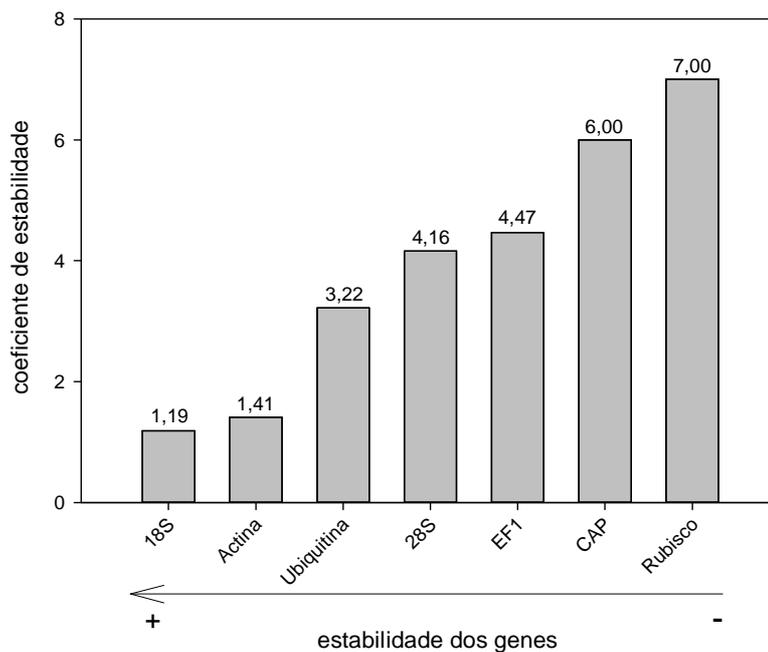


FIGURA 4. Classificação abrangente e coeficientes de estabilidade de sete genes referência candidatos em folhas de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas com imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

4.3.4 Análise de expressão do gene ALS

A expressão relativa do gene *ALS* não foi alterada pelos tratamentos avaliados (figura 5). Tanto na população ARRGR01 (figura 5A) quanto na população PALMS01 (figura 5B), a expressão foi semelhante à observada na população suscetível SUSSP01. A aspersão de imazethapyr não causou efeito na expressão relativa do gene *ALS*. Dessa forma, pode-se afirmar que a maior expressão ou o maior número de cópias do gene *ALS* não atuam como mecanismos de resistência ao imazethapyr nessas populações de capim-arroz. Estes resultados somam-se aos encontrados anteriormente, onde não foram encontradas mutações no gene *ALS* relacionadas à resistência a herbicidas nestas populações (Matzenbacher *et al.*, 2015). Em conjunto, estes resultados indicam que a resistência a herbicidas nas populações ARRGR01 e PALMS01 não é causada por mecanismos de resistência RLA.

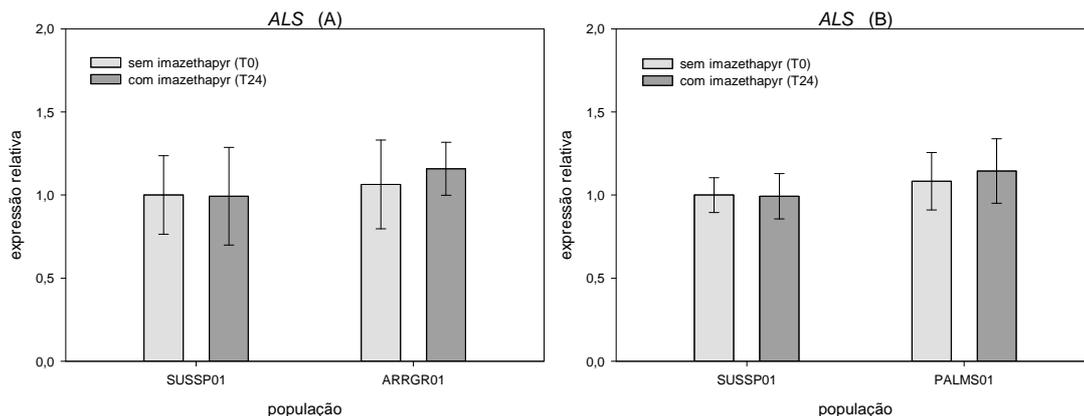


FIGURA 5. Expressão relativa do gene *ALS* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01 e PALMS01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

4.3.5 Análise de expressão dos genes *CYP* e *GST*

Dentre todos os genes *CYP* e *GST* avaliados, foi observada a expressão diferencial de um gene *CYP* e um gene *GST*. O gene *CYP8IA6* apresentou maior expressão na população resistente PALMS01 (figura 6) quando as plantas foram tratadas com o herbicida imazethapyr. A expressão relativa da população resistente ARRGR01 tratada com o herbicida imazethapyr avaliada 24 após a aplicação (T24) foi 9,61 vezes maior em comparação à população suscetível não tratada (T0) (figuras 6A e 9A). Na população PALMS01 (figura 6B), a expressão relativa foi 8,44 vezes superior quando as plantas foram aspergidas com imazethapyr (T24). A expressão do gene *CYP8IA6*, mesmo na ausência de herbicida, foi superior na população PALMS01. A expressão relativa desse gene foi 1,67 e 4,96 vezes superior em plantas das populações resistentes ARRGR01 e PALMS01, respectivamente. Dessa forma, além da expressão do gene *CYP8IA6* ser maior constitutivamente nas populações resistentes, a aspersão do herbicida imazethapyr induziu a maior expressão desse gene.

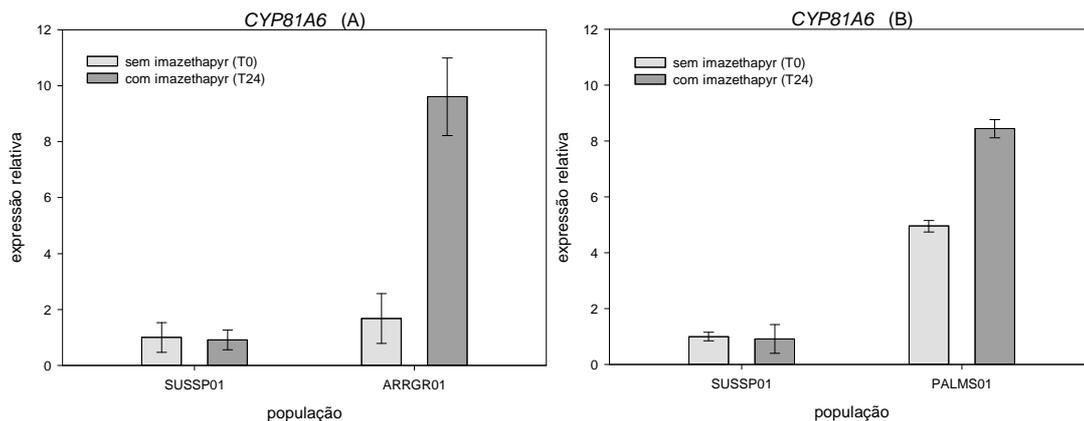


FIGURA 6. Expressão relativa do gene *CYP81A6* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01 e PALMS01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Dados obtidos de três repetições biológicas. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Algumas espécies poáceas, tais como arroz (*Oryza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*) são naturalmente tolerantes aos herbicidas bentazon (inibidor do FSII) e às sulfoniluréias (inibidores da enzima ALS). A seletividade desses herbicidas sobre essas culturas é atribuída à presença do gene *CYP81A6*, responsável pela fase I da detoxificação desses herbicidas nas plantas (Pan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). A inserção desse gene em espécies não poáceas, tais como *A. thaliana* e *Nicotiana tabacum* conferiu tolerância a esses herbicidas (Liu *et al.*, 2012). De maneira oposta, o silenciamento desse gene por meio de RNA de interferência tornou plantas de arroz, antes tolerantes, sensíveis ao herbicida bentazon, comprovando a função desse gene no processo de detoxificação de herbicidas em plantas (Liu *et al.*, 2012).

No presente estudo, a aspersão do herbicida imazethapyr induziu a expressão do gene *CYP81A6* nas duas populações resistentes avaliadas (figura 6). Na população ARRGR01, a expressão relativa em plantas não tratadas (T0) e tratadas (T24) foi igual a 1,67 e 9,61, respectivamente. Na população PALMS01, a aspersão de imazethapyr

aumentou a expressão de 4,96 (T0) para 8,44 (T24). Resultados semelhantes foram observados em arroz, em que tanto a aspersão de bentazon quanto de metsulfuron-methyl causou o aumento da expressão do gene *CYP81A6* (Lu *et al.*, 2015).

Na população PALMS01, em plantas coletadas no T24, foi observada a maior expressão do gene *GSTF1* (figura 7). Na população ARRGR01 (figuras 7A e 9A), em plantas tratadas com imazethapyr (T24), a expressão desse gene foi 6,41 vezes superior à população suscetível SUSSP01 (T0). Contudo, na ausência do herbicida (T0), a expressão relativa foi semelhante à observada na população suscetível. Na população PALMS01 (figura 7B), a expressão relativa do gene *GSTF1* foi superior tanto em plantas não tratadas (T0) quanto em plantas tratadas (T24) com imazethapyr. Em plantas não tratadas (T0), a expressão relativa foi 10,24 vezes superior à população suscetível, ao passo que em plantas tratadas (T24), a expressão foi 12,30 vezes maior. Observa-se ainda que, mesmo em plantas suscetíveis, houve maior expressão desse gene em plantas tratadas (T24) com imazethapyr.

As enzimas GST estão envolvidas na fase II da metabolização de herbicidas em plantas. Nesta fase ocorre a conjugação da molécula do herbicida com glutathione, após ser ativada na fase I (Yuan *et al.*, 2007). No entanto, essas enzimas também podem apresentar outras funções nas plantas, tais como a atividade peroxidase e a sinalização para a produção de metabólitos secundários que agem na defesa contra estresses (Dixon *et al.*, 2010; Powles & Yu 2010). Em *A.myosurioides*, o gene *GSTF1* apresentou baixa atividade detoxificadora de herbicidas, porém, foi altamente ativo como uma glutathione peroxidase, catalisando a redução de hidroperóxidos orgânicos (Cummins *et al.*, 1999). A inserção desse mesmo gene em *Arabidopsis thaliana* resultou na resistência múltipla a herbicidas devido a maior atividade de enzimas peroxidases e ao maior acúmulo de compostos antioxidantes (glutathionas, flavonoides e antocianinas) (Cummins *et al.*,

2013). Embora existam poucas informações a respeito da formação de espécies reativas de oxigênio por herbicidas inibidores da ALS, alguns trabalhos com estes herbicidas demonstram o aumento dos níveis de determinadas enzimas antioxidantes em função da presença desses herbicidas (Wang & Zhou, 2006; Wang *et al.*, 2009).

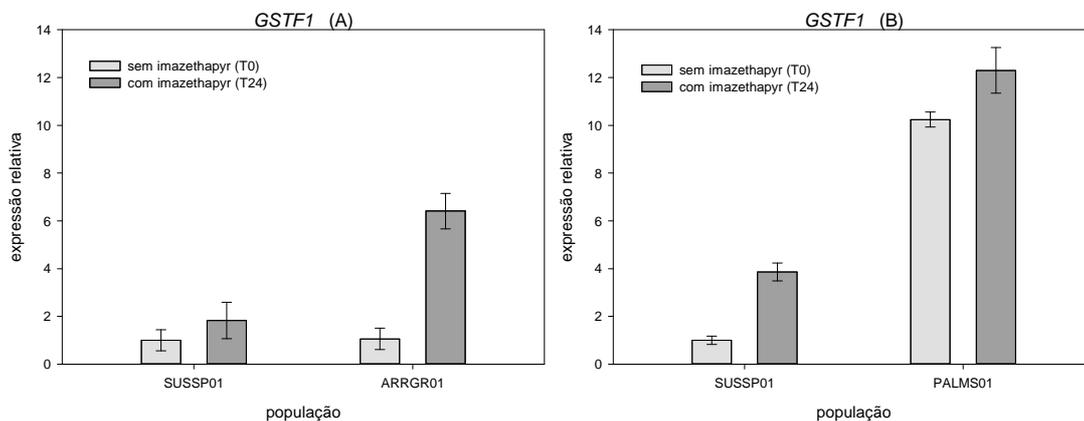


FIGURA 7. Expressão relativa do gene *GSTF1* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01 (A) e PALMS01 (B)) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Dados obtidos de três repetições biológicas. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

4.3.6 Análise de expressão do gene *eIF4B*

Além da maior expressão dos genes *CYP81A6* e *GSTF1*, foi observada a maior expressão do fator iniciador de tradução *eIF4B* (figura 8). A expressão relativa desse gene na população ARRGR01 foi 2,51 vezes superior em plantas não tratadas (T0) e 6,46 vezes superior em plantas tratadas (T24) com imazethapyr (figuras 8A e 9C). Na população PALMS01 (figura 8B), a expressão relativa foi 2,30 vezes superior em plantas não tratadas (T0) e 5,96 vezes superior em plantas tratadas (T24) com imazethapyr. Na população suscetível SUSSP01 (figuras 8 e 9C), observa-se que a expressão relativa desse gene foi superior em plantas tratadas com o herbicida. Dessa forma, em todas as populações, a aspersão de imazethapyr induziu a expressão do gene *eIF4B*.

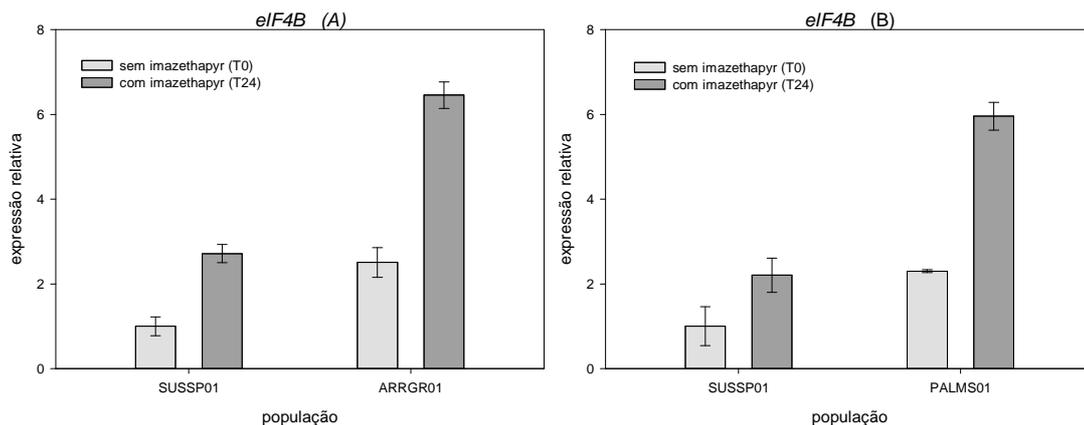


FIGURA 8. Expressão relativa do gene *eIF4B* em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Dados obtidos de três repetições biológicas. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

O fator de iniciação de tradução *eIF4B*, juntamente com outras proteínas que também atuam como fatores iniciadores de tradução, é responsável pelo processo de reconhecimento do mRNA pelos ribossomos durante o processo de síntese protéica (Spriggs *et al.*, 2010). Essa proteína apresenta função helicase, responsável pelo desenrolamento de alguns mRNA na região 5'-UTR e exposição do códon inicial (AUG) para o início da tradução nos ribossomos (Shahbazian *et al.*, 2010). A expressão diferencial desse fator iniciador de tradução está relacionada com a ocorrência de estresses em plantas, sendo importante na regulação gênica pós-transcricional em eucariotos (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Além disso, a maior expressão desse gene está diretamente relacionada com a menor eficiência de quimioterápicos no tratamento de células cancerígenas, havendo uma alta correlação entre a maior expressão do fator iniciador *eIF4B* e a maior produção de proteínas responsáveis por doenças cancerígenas (Degen *et al.*, 2013). Dessa forma, dependendo da estrutura do mRNA na região 5'UTR, a maior expressão de fatores iniciadores de tradução (*eIF4B*) pode culminar no maior conteúdo de enzimas detoxificadoras, tais como as enzimas P450 e GST.

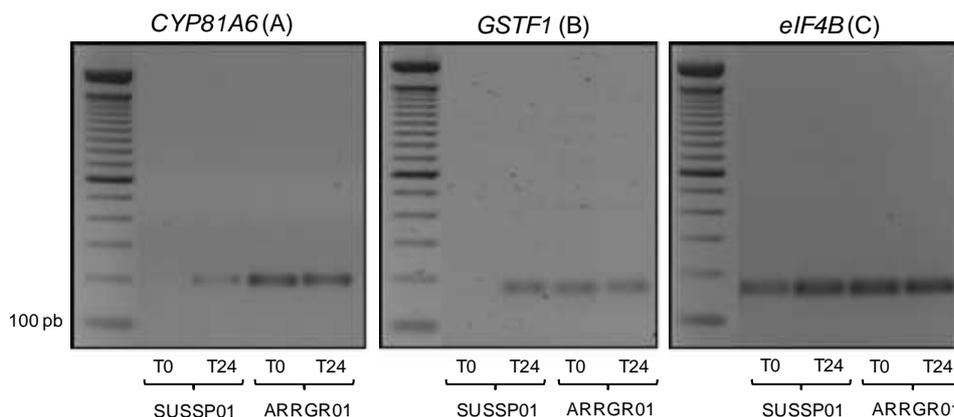


FIGURA 9. Expressão dos genes *CYP81A6* (A), *GSTF1* (B) e *eIF4B* (C) em plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01) às imidazolinonas, em resposta à aspersão de imazethapyr. T0; plantas não tratadas; T24: 24 horas após a aspersão de imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de estabilidade da expressão de genes reguladores demonstrou que os genes *18S* e *actina* foram os mais estáveis em plantas de capim-arroz suscetíveis e resistentes as imidazolinonas, submetidas ou não ao estresse pelo herbicida imazethapyr. A análise de estabilidade foi realizada em cinco métodos (algoritmos) diferentes, e estes genes foram os mais estáveis em todos os métodos avaliados.

A análise de expressão do gene *ALS* demonstrou que a quantidade de transcritos em todas as populações avaliadas foi semelhante, não havendo diferenças entre plantas tratadas e não tratadas com imazethapyr. Dessa forma, pode-se afirmar que a maior expressão do gene *ALS* não é a causa da resistência das populações avaliadas neste estudo.

Os genes *CYP81A6* e *GSTF1* apresentaram maior expressão relativa nas populações resistentes. O gene *CYP81A6* apresentou expressão 9,61 e 8,44 vezes superior nas populações ARRGR01 e SUSSP01, respectivamente. A expressão desse

gene foi induzida pela aspersão do herbicida imazethapyr. O gene *GSTF1* apresentou maior expressão relativa na população PALMS01, sendo 12,3 vezes superior nas plantas tratadas com imazethapyr. Além desses genes, a maior expressão do fator iniciador de tradução *eIF4B* pode estar envolvida na resistência dessas populações ao herbicida imazethapyr.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D. et al. Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. especial, p. 993-1003, 2010.

ANDERSEN, C. L. et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

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

BUSI, R. et al. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, London, v. 106, n. 5, p. 817-824, 2011.

CUMMINS, I. et al. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **PNAS**, Washington, v. 110, n. 15, p. 5812-5817, 2013.

DÉLYE, C. et al. Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 433-437, 2012.

DIXON, D. P. et al. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2002.

DIXON, D. P. et al. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, New York, v. 71, n. 1, p. 338-350, 2010.

DUHOUX, A.; DÉLYE, C. Reference genes to study herbicide stress response in *Lolium* sp.: up-regulation of P450 genes in plants resistant to acetolactate-synthase inhibitors. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2013.

- DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, London, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.
- HU, T. et al. Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 409-418, 2009.
- HU, T. A glutathione s-transferase confers herbicide tolerance in rice. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 76-81, 2014.
- IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014a.
- IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, London, v. 70, n. 4, p. 549-558, 2014b.
- LI, G. et al. Identification and expression pattern of a glutathione S-transferase in *Echinochloa crus-galli*. **Weed Research**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 314-321, 2013.
- LIU, C. et al. A built-in mechanism to mitigate the spread of insect-resistance and herbicide-tolerance transgenes into weedy rice populations. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2012.
- LIU, C. et al. Expression of a rice CYP81A6 gene confers tolerance to bentazon and sulfonylurea herbicides in both *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 3, p. 419-428, 2012.
- LU, H. et al. Expression of cytochrome P450 CYP81A6 in rice: tissue specificity, protein subcellular localization, and response to herbicide application. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, Hangzhou, v. 16, n. 2, p. 113-122, 2015.
- MATZENBACHER, F. O. et al. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015.
- PAN, G. et al. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, n. 6, p. 933-943, 2006.
- PETIT, C. et al. Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. **BMC Research Notes**, London, v. 5, n. 18, p. 1-10, 2012.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PINTO, J. J. O. et al. Controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 767-777, 2008.

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

SAIKA, H. et al. A novel rice cytochrome P450 gene, CYP72A31, confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 166, n. 3, p. 1232-1240, 2014.

SHAHBAZIAN, D. et al. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 30, n. 6, p. 1478-1485, 2010.

SILVER, N. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 33, p. 1-9, 2006.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 731-745, 2009.

SPIRGGS, K. A. et al. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 228-237, 2010.

STÜRZENBAUM, S. R.; KILLE, P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 130, n. 3, p. 281-289, 2001.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 291-295, 1999.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

WANG, M. et al. Toxicological responses in wheat *Triticum aestivum* under joint stress of chlorimuron-ethyl and copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 2121-2129, 2009.

WANG, M.; ZHOU, Q. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 190-197, 2006.

WANG, X. et al. Identification of the valid reference genes for quantitative rt-pcr in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) under salt stress. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 3, p. 4833-4847, 2015.

WILSON, M. J. Herbicide programs for controlling ALS-resistant barnyardgrass in Clearfield rice. In: RICE TECHNICAL WORKING GROUP MEETING, 2010, Biloxi. **Proceedings of the**. Biloxi, MS: Rice Technical Working Group, 2010.

XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.

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

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

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicides resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop protection. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 166, n. 3, p. 1106-1118, 2014.

YUAN, J. S. et al. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

ZHANG, L. et al. Identification of a cytochrome P450 hydroxylase, CYP81A6, as the candidate for the bentazon and sulfonyleurea herbicide resistance gene, Bel, in rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 59-68, 2007.

5 CAPÍTULO 4- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ E DA TEMPERATURA SOBRE O CONTROLE, CRESCIMENTO E PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS DE CAPIM-ARROZ

RESUMO

A investigação do efeito dos cenários de mudança climática sobre a biologia e controle de plantas daninhas é importante devido a possível alteração da dinâmica de competição interespecífica e eficiência de herbicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da concentração de CO₂ e da temperatura em capim-arroz resistente ao imazethapyr cujo mecanismo de resistência é devido ao incremento de metabolização. Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento. Os tratamentos constaram de populações suscetíveis (SUSSP01 e MOSTS01) e resistentes (ARRGR01 e PALMS01) ao herbicida imazethapyr, doses de 6,625 a 848 g ha⁻¹ deste herbicida, das temperaturas de 24/20°C e 30/26°C dia/noite, e das concentrações de CO₂ de 400 e 700 ppm. As avaliações constaram do controle, teor relativo de clorofila (TRC), taxa de transporte de elétrons (ETR), número de perfilhos por planta (NPP), massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria seca de raiz (MMSR) e relação parte aérea/raiz (PA/R). O controle de plantas de capim-arroz resistentes foi inferior com o aumento da concentração de CO₂ e temperatura. Aos 14 dias após o tratamento, com o aumento da temperatura de 24/20 para 30/26°C, o fator de resistência (FR) em plantas cultivadas sob 400 ppm aumentou 72% e 55% para as populações ARRGR01 e PALMS01, respectivamente. Quando cultivadas em 700 ppm, o aumento do FR foi de 43% (ARRGR01) e 46,5% (PALMS01) em resposta ao aumento da temperatura. Plantas cultivadas em maiores temperaturas e concentração de CO₂ apresentaram maior NPP, MMSPA e MMSR. O TRC foi inferior em condições de temperatura elevada. A ETR foi severamente reduzida pelo aumento da concentração de CO₂ em plantas cultivadas em temperatura de 24/20°C. Os aumentos da temperatura e da concentração de CO₂ tornaram as plantas resistentes ainda mais insensíveis ao herbicida imazethapyr.

CHAPTER 4- EFFECT OF CO₂ CONCENTRATION AND TEMPERATURE ON CONTROL AND GROWTH OF BARNYARDGRASS RESISTANT TO IMAZETHAPYR

ABSTRACT

The study of the effect of climate change on the weed biology and control is important due to the possible change of interspecific competition and herbicide efficiency. The aim of this study was to evaluate the effect of CO₂ concentration and temperature on barnyardgrass resistant to imazethapyr, which resistance is related with the herbicide degradation enhancement. Experiments were performed in growth chamber. Treatments consisted of populations susceptible (PALMS01) and resistant (ARRGR01) to imazethapyr, doses of 6.625 to 848 g ha⁻¹ of this herbicide, temperatures of 24/20°C and 30/26°C (day/night) and CO₂ concentration of 400 and 700 ppm. The evaluations were control of plants, relative chlorophyll content (RCC), electron transport rate (ETR), number of tillers per plant (NTP), dry matter of shoot (DMS), dry matter of root (DMR) and ratio shoot/root (S/R). The effect of imazethapyr on barnyardgrass was lower with the increasing temperature and CO₂ concentration. For the plants at 400 ppm, at 14 days after the treatment, the increasing of temperature from 24/20 to 30/26°C increased the resistance factor (RF) by 72% and 55% for the ARRGR01 and PALMS01 populations, respectively. When grown at 700 ppm, the increased of the RF was 43% for the ARRGR01 and 46.5% for the PALMS01 populations in response to increasing temperature. Plants grown at higher temperatures and CO₂ concentration showed higher NTP, DMS and DMR. The RCC was inferior in high temperature conditions. The ETR was severely reduced by increasing the concentration of CO₂ in plants grown under temperature of 24/20°C. The increasing of temperature and CO₂ concentration increase the level of resistance of barnyardgrass resistant to the herbicide imazethapyr.

5.1 INTRODUÇÃO

Ao mesmo tempo em que o CO₂ e a temperatura são os principais fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas, esses dois fatores são os principais componentes que promovem a atual mudança climática em nosso planeta (Solomon, 2007; Sheppard & Stanley, 2014;). Juntamente com variações da magnitude desses dois fatores, tem se encontrado alterações em sistemas agrícolas, incluindo aspectos relacionados às plantas daninhas (Ziska, 2000; Clements & Ditommaso, 2011). Com a mudança climática, algumas espécies de plantas daninhas estão sendo favorecidas em detrimento de outras, alterando a composição da flora nas áreas de cultivo (Peters *et al.*, 2014).

Vários experimentos que avaliam a competição de plantas daninhas têm sido conduzidos a fim de caracterizar os efeitos da elevação das temperaturas e concentrações de CO₂ sobre a fisiologia e o crescimento das espécies vegetais (McDonald *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Do ponto de vista adaptativo e de dispersão das espécies, espera-se que o impacto de plantas daninhas aumente com o cenário de mudança climática (Thuiller *et al.*, 2006). Por outro lado, do ponto de vista de competição, pesquisas apontam para o decréscimo da interferência das plantas daninhas sobre as culturas (Davis & Ainsworth, 2012). Isso se explica devido ao fato de que a maioria das plantas cultivadas apresenta metabolismo fotossintético C₃. Por serem mais eficientes fotossinteticamente, as plantas C₄ (maioria das plantas daninhas poáceas) respondem menos a incrementos na concentração de CO₂ atmosférico, uma vez que o

ponto de saturação de 360 ppm é inferior à concentração presente na atmosfera atualmente (401,62 ppm em dezembro de 2015) (NOAA, 2016; IPCC, 2014; Leegood, 2002). Dessa forma, a resposta à fertilização de CO₂ é menor em plantas C₄ em relação às C₃ (Ziska & McConnell, 2016).

Além das alterações no crescimento e biologia geradas nas plantas daninhas pela mudança climática (Dukes *et al.*, 2011; Blumenthal *et al.*, 2013), o controle dessas espécies por meio de herbicidas também pode ser alterado. Uma série de estudos realizados com o herbicida glyphosate demonstra que a resistência de várias espécies de plantas daninhas (tanto C₃ quanto C₄) foi favorecida com o aumento da concentração de CO₂ (Ziska *et al.*, 1999; Ziska *et al.*, 2004; Manea *et al.*, 2011). De modo semelhante, em trabalho realizado com 24 espécies de plantas daninhas foi verificada a ocorrência de aumento da tolerância dessas espécies aos herbicidas em condições de elevação na concentração de CO₂ (Downey *et al.*, 2012).

O efeito positivo do aumento na concentração de CO₂ pode ser inibido pelo aumento da temperatura, principalmente em plantas C₃, já que plantas C₄ são mais eficientes fotossinteticamente que plantas C₃ sob temperaturas mais elevadas (Peters *et al.*, 2014). Além disso, os processos enzimáticos relacionados ao funcionamento e resistência de plantas daninhas aos herbicidas estão relacionados à temperatura, podendo gerar alterações na intoxicação das plantas (Mahan *et al.*, 2004).

O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz-irrigado no sul do Brasil (Agostinetto *et al.*, 2010). Trata-se de uma espécie com metabolismo de carbono C₄, com populações resistentes a vários herbicidas, entre eles as imidazolinonas (Heap, 2016), incluindo populações em que o incremento de detoxificação está envolvido no processo de resistência (Matzenbacher *et al.*, 2015). As imidazolinonas são herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase

(ALS), responsável pela síntese dos aminoácidos essenciais de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Powles & Yu, 2010). Alguns estudos indicam o maior acúmulo de biomassa e antecipação do ciclo de capim-arroz sob temperaturas elevadas (Peters & Gerowitt, 2014). No entanto, não há a descrito os efeitos da interação da temperatura com a concentração de CO₂ sobre o crescimento e controle dessa espécie com herbicidas. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da temperatura e da concentração de CO₂ sobre o controle de plantas de capim-arroz tratadas com imazethapyr e determinar o efeito dessas variações sobre o crescimento e parâmetros fisiológicos de plantas dessa espécie.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

A superação da dormência das sementes para todos os experimentos foi realizada por meio da imersão das sementes em solução de KNO₃ (0,2%), em temperatura de 25°C, até o início da germinação (emissão da radícula), o que ocorreu, aproximadamente, quatro dias após a imersão. Após, as sementes foram enxaguadas em água destilada e acondicionadas em placas de Petri até a emissão da primeira folha para que, em seguida, fossem transplantadas em vasos de 200 mL. Como substrato foi utilizada a mistura de argissolo e composto orgânico, na proporção de 10:1, além da complementação com fertilizante mineral. As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento (Convion ATC 40 e BDR16). O fotoperíodo utilizado foi de 12/12 horas (dia/noite), com intensidade luminosa de 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5.2.1 Experimento 1- Efeito da concentração de CO₂ e da temperatura sobre controle de capim-arroz tratadas com imazethapyr

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (4x2x2x7), com quatro repetições. O fator A foi composto por populações de capim-arroz, sendo duas suscetíveis (SUSSP01 e MOSTS01) e duas resistentes (ARRGR01 e PALMS01) ao herbicida imazethapyr. Estudos prévios indicaram que o incremento de metabolização está envolvido no processo de resistência nestas populações (capítulo 3). O fator B foi composto pelas concentrações de CO₂ de 400 ppm (ambiente) e 700 ppm. O fator C foi formado pelas temperaturas 24/20°C e 30/26°C (dia/noite). O fator D foi formado por doses do herbicida imazethapyr, formando curvas de dose-resposta. Para as populações suscetíveis as doses utilizadas foram 0; 6,625; 13,25; 26,5; 53; 106 e 212 g ha⁻¹. Nas resistentes, as doses utilizadas foram 0; 26,5; 53; 106; 212; 424 e 848 g ha⁻¹. Baseado em experimentos prévios, o intervalo de doses utilizadas nas populações suscetíveis foi menor, uma vez que as plantas são mais sensíveis ao herbicida imazethapyr. Em todos os tratamentos foi acrescido o adjuvante Dash (0,5% v/v).

A aspersão dos tratamentos foi realizada quando as plantas estavam com três folhas. As plantas cultivadas sob temperatura de 24/20°C e 30/26°C atingiram o estágio de aspersão do herbicida aos 8 e 7 dias após o transplante das plântulas e acomodação nas câmaras, respectivamente. A aspersão do herbicida foi realizada em câmara de pulverização automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), utilizando-se ponta de pulverização TJ8002E, com pressão constante de 42 lb pol⁻² e velocidade de deslocamento de 1,16 m s⁻¹, gerando o volume de calda de 200 L ha⁻¹.

O controle foi avaliado aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) por meio de escala visual, em que zero significa ausência de sintomas e 100 significa morte da planta. A massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) foi mensurada aos

14 DAT, após a secagem das plantas em estufa (60°C) até as mesmas atingirem massa constante. Os dados foram submetidos à análise de variância e ajustados pelo modelo logístico de 3 parâmetros $[y = a / (1 + (x/x_0)^b)]$. Para a determinação dos valores de C_{50} o y da equação foi substituído por 50 (50% de controle), conforme proposto por Carvalho *et al.* (2005). Para os fatores qualitativos (populações de capim-arroz e inibidores de enzimas P450), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados de porcentagem de controle foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

5.2.2 Experimento 2- Efeito da concentração de CO₂ e da temperatura sobre o crescimento e parâmetros fisiológicos em plantas de capim-arroz

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (4x2x2), com quatro repetições. O fator A foi composto por populações de capim-arroz, sendo duas suscetíveis (SUSSP01 e MOSTS01) e duas resistentes (ARRGR01 e PALMS01) ao herbicida imazethapyr. O fator B foi composto por duas concentrações de CO₂ atmosférico, sendo utilizadas as concentrações de 400 ppm (ambiente) e 700 ppm. O fator C foi formado pelas temperaturas 24/20°C e 30/26°C (dia/noite).

Aos 21 dias após a instalação do experimento foram avaliados o número de perfilhos por planta (NPP), teor relativo de clorofila (TRC), a fluorescência (F), a taxa de transporte de elétrons (ETR) massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria seca de raiz (MMSR) e a relação parte aérea/raiz (PA/R). As plantas foram mantidas em estufa (60°C) até atingirem massa constante. O teor relativo de clorofila foi mensurado com clorofilômetro SPAD 502, e os valores de fluorescência e taxa de transporte de elétrons foram mensurados com o equipamento OS1-FL Chlorophyll Fluorometer (Opti-sciences). Ambas as avaliações dos parâmetros fotossintéticos foram

realizadas na última folha expandida de cada planta, anteriormente à colheita. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Experimento 1- Efeito da concentração de CO₂ e da temperatura sobre controle de capim-arroz tratadas com imazethapyr

Na primeira avaliação, aos 7 DAT, a interação entre os fatores avaliados foi significativa (anexo 1a). Nas populações suscetíveis o controle foi superior nas plantas cultivadas na temperatura mais elevada (30/26°C dia/noite), independentemente da concentração de CO₂ e dose do herbicida (figuras 1a e 1b). Para a população SUSSP01 (figura 1a), na dose recomendada do herbicida imazethapyr (106 g ha⁻¹), o controle foi de 80% e 90% para as concentrações de 400 ppm e 700 ppm de CO₂, respectivamente, na temperatura de 24/20°C. Contudo, as plantas cultivadas sob temperatura de 30/26°C apresentaram controle de 97,5% e 100%. Na população MOSTS01 (figura 1b), nessas mesmas condições, o incremento no controle foi de aproximadamente 20% com o aumento da temperatura, em ambas as concentrações de CO₂. Por outro lado, nas populações resistentes (figuras 1c e 1d) o controle foi superior nas plantas cultivadas em temperatura inferior, de 24/20°C. Essa resposta foi observada nas doses inferiores à recomendada (106 g ha⁻¹ de imazethapyr). Na dose de 26,5 g ha⁻¹ de imazethapyr, na população PALMS01 (figura 1d), o controle foi de 71,25% sob temperatura de 24/20°C, em ambas as concentrações de CO₂. Na temperatura de 30/26°C, o controle foi reduzido para 52,5%, independentemente da concentração de CO₂. Na população ARRG01

(figura 1c) também houve redução no controle com o aumento da temperatura, porém, em menor proporção ao observado na população PALMS01.

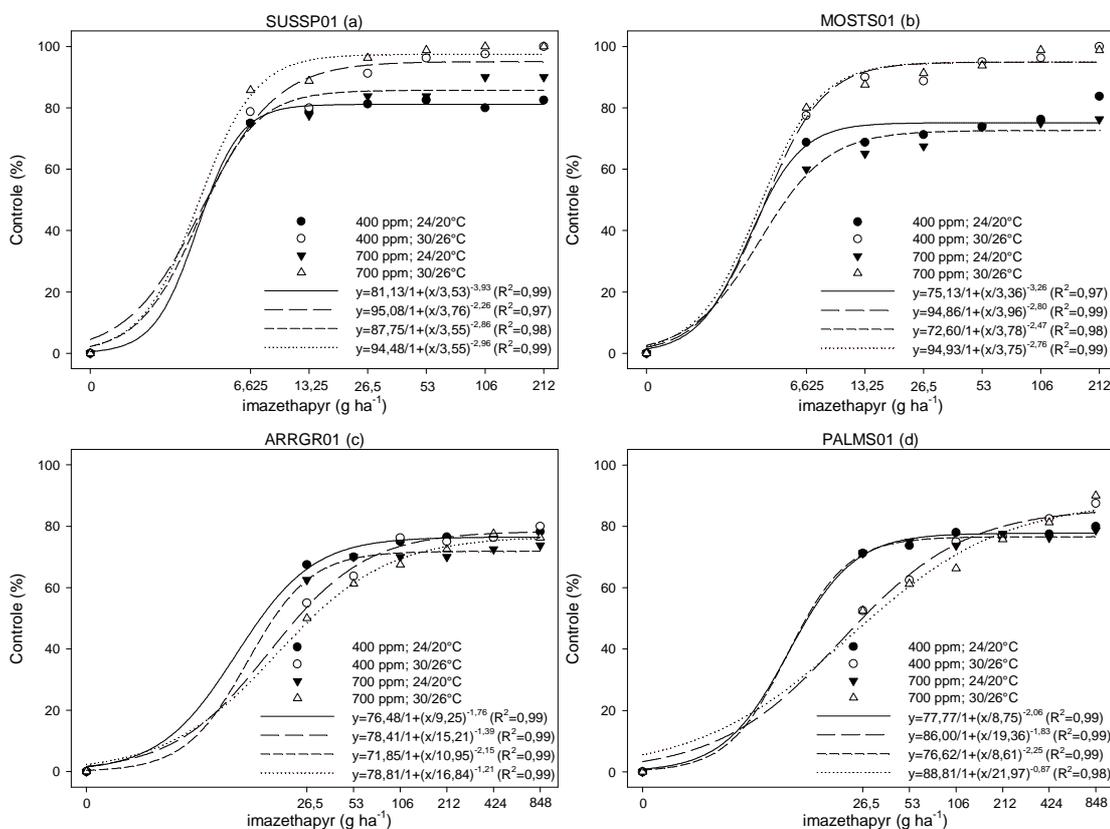


FIGURA 1. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Os valores de C₅₀ (tabela 1) e fator de resistência (FR) (tabela 3) também variaram de acordo com a concentração de CO₂ e temperatura, sobretudo nas populações resistentes. Os maiores valores de C₅₀ e FR foram observados nas plantas cultivadas em maiores temperatura e concentração de CO₂. Na população PALMS01, as C₅₀ para a concentração de 400 ppm de CO₂ foram de 11,64 e 23,17 g ha⁻¹ de imazethapyr para as temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente. Na concentração de 700 ppm, as C₅₀ foram de 11,39 e 29,40 g ha⁻¹ de imazethapyr para as

temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente. Para essa mesma população os valores de FR foram de 2,92 para o tratamento que combinou a menor temperatura e menor concentração de CO₂ (24/20°C e 400 ppm). Quando as plantas foram cultivadas em temperatura de 30/26°C e 700 ppm de CO₂, o FR aumentou para 7,38.

Aos 14 DAT a interação entre todos os fatores não foi significativa (anexo 1b). Porém, as interações triplas foram significativas, exceto a interação entre os fatores população, concentração de CO₂ e temperatura. O controle de plantas suscetíveis observado (figuras 2a e 2b), assim como aos 7 DAT, foi superior sob maiores temperaturas (30/26°C) na população SUSSP01 e nas menores doses de imazethapyr avaliadas. Contudo, nas populações resistentes (figuras 2c e 2d), o controle foi inferior sob as maiores temperaturas (30/26°C) e maior concentração de CO₂ (700 ppm). As diferenças mais significativas foram observadas em doses inferiores à recomendada (106 g ha⁻¹ de imazethapyr) (AGROFIT, 2016). Na dose de 26,5 g ha⁻¹ de imazethapyr, as plantas cultivadas em concentração de 400 ppm de CO₂ apresentaram controle de 62,5% e 42,5% para as temperaturas de 24/20°C e 30/20°C, respectivamente. Para a concentração de 700 ppm de CO₂, os valores de controle foram reduzidos para 53,75 % e 36,25% para as temperaturas de 24/20°C e 30/20°C, respectivamente.

As variações nos índices de controle observados geraram, conseqüentemente, valores de C₅₀ e FR distintos (tabelas 1 e 3). Nas populações suscetíveis não houve variação desses valores em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Contudo, na população resistente ARRGR01, os valores de C₅₀ na concentração de 400 ppm de CO₂ foram de 20,58 e 73,87 g ha⁻¹ de imazethapyr para as temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente. Na concentração de CO₂ de 700 ppm, as C₅₀ foram de 32,92 e 57,77 g ha⁻¹ de imazethapyr para as temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente. Esses valores geraram FRs de 5,45 e 19,55 para a concentração de 400

ppm de CO₂ nas temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente e, na concentração de 400 ppm de CO₂, de 8,71 e 15,29 para as temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente. Na população PALMS01, os valores de C₅₀ a 400 ppm passaram de 16,43 para 36,57 g ha⁻¹ de imazethapyr com o aumento da temperatura. Na concentração de 700 ppm, os valores de C₅₀ passaram de 30,13 para 56,30 g ha⁻¹ de imazethapyr com o aumento da temperatura de 24/20°C para 30/26°C, respectivamente. O valor do FR a 400 ppm de CO₂ subiu de 4,35 para 9,68 com o aumento da temperatura. Quando cultivadas a 700 ppm de CO₂, o FR passou de 7,97 para 14,9 com o aumento da temperatura de 24/20°C para 30/26°C, respectivamente.

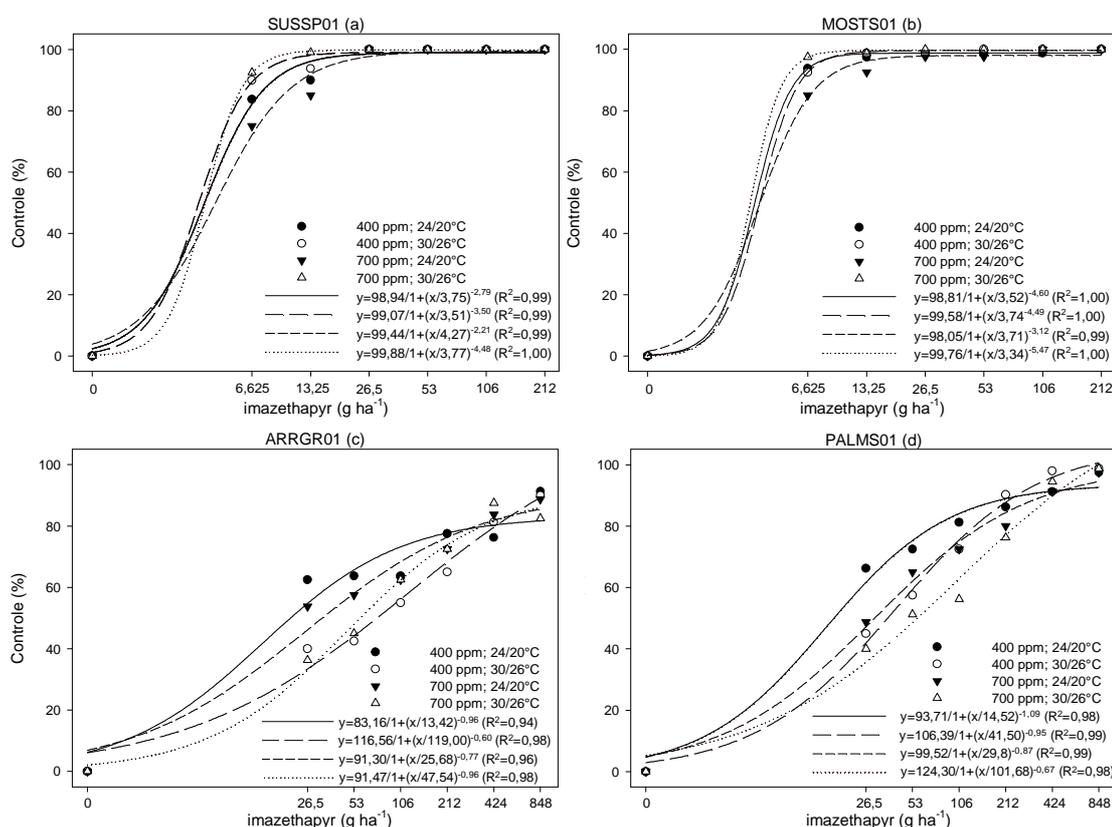


FIGURA 2. Controle (%) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Nas populações suscetíveis, o maior controle observado sob maiores temperaturas pode estar relacionado à maior absorção e translocação do herbicida imazethapyr na temperatura de 30/26°C. Uma série de experimentos demonstra a maior fitointoxicação de plantas por herbicidas em condições de temperaturas elevadas (Kent *et al.*, 1991; Polge & Barret, 1997; Olson *et al.*, 2000). A ocorrência de maior absorção de herbicidas em condições de altas temperaturas ocorre devido à maior permeabilidade da membrana plasmática nessas condições (Los & Murata, 2004). A maior translocação de herbicidas sistêmicos sob altas temperaturas ocorre pelo fato de que essas condições coincidem com as condições em que as plantas C₄, tais qual o capim-arroz, apresentam a maior atividade fotossintética. Dessa forma, ao contrário das populações resistentes, como as populações suscetíveis não apresentam enzimas detoxificadoras em quantidade suficiente para que ocorra a metabolização do herbicida, as plantas suscetíveis são ainda mais sensíveis ao herbicida imazethapyr em temperaturas mais elevadas.

Nas populações resistentes, o cenário de mudança climática simulado neste experimento aumentou a tolerância das plantas ao herbicida imazethapyr. Estudos demonstram que a fitointoxicação de plantas tratadas com herbicidas é menor sob altas temperaturas, uma vez que a atividade detoxificadora dessas enzimas é favorecida. Em *Amaranthus palmeri*, tanto a velocidade de metabolização quanto a quantidade de mesotrione metabolizada por enzimas detoxificadoras foram superiores sob temperaturas elevadas (Godar *et al.*, 2015). De modo semelhante, espécies gramíneas apresentaram 56% e 68% de metabolização de amicarbazone em temperaturas de 25/20°C e 40/35°C, respectivamente (Yu *et al.*, 2015). Na cultura do milho, temperaturas entre 25-30°C proporcionaram seletividade máxima ao herbicida rimsulfuron, o que não foi observado na temperatura de 10°C (Koeppel *et al.*, 2000).

TABELA 1. Parâmetros da equação logística e C_{50} para a variável controle de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO_2 (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 7 e 14 dias após a aspersão do herbicida. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento		a	b	X_0	C_{50}	IC
		7 DAT				
SUSSP01	400 ppm; 24/20°C	81,03	-3,93	3,53	3,99	± 0,78
	400 ppm; 30/26°C	95,08	-2,26	3,76	3,94	± 0,88
	700 ppm; 24/20°C	85,75	-2,86	3,55	3,99	± 0,93
	700 ppm; 30/26°C	94,48	-2,96	3,55	3,69	± 0,77
MOSTS01	400 ppm; 24/20°C	75,13	-3,26	1,58	1,95	± 1,55
	400 ppm; 30/26°C	94,86	-2,8	0,8	0,83	± 0,78
	700 ppm; 24/20°C	72,6	-2,47	0,84	1,16	± 0,82
	700 ppm; 30/26°C	94,93	-2,76	0,75	0,78	± 0,73
ARRGR01	400 ppm; 24/20°C	76,48	-1,76	9,25	13,27	± 2,35
	400 ppm; 30/26°C	78,41	-1,39	15,21	22,84	± 2,55
	700 ppm; 24/20°C	71,85	-2,15	10,95	16,09	± 3,54
	700 ppm; 30/26°C	78,81	-1,21	16,84	26,56	± 1,89
PALMS01	400 ppm; 24/20°C	77,77	-2,06	8,75	11,64	± 2,80
	400 ppm; 30/26°C	86,00	-1,83	19,36	23,17	± 2,70
	700 ppm; 24/20°C	76,62	-2,25	8,61	11,39	± 3,73
	700 ppm; 30/26°C	88,81	-0,87	21,97	29,40	± 5,64
14 DAT						
SUSSP01	400 ppm; 24/20°C	98,94	-2,79	3,75	3,78	± 0,63
	400 ppm; 30/26°C	99,07	-3,5	3,51	3,53	± 0,70
	700 ppm; 24/20°C	99,44	-2,21	4,27	4,29	± 0,59
	700 ppm; 30/26°C	99,88	-4,48	3,77	3,77	± 0,27
MOSTS01	400 ppm; 24/20°C	98,81	-4,6	3,52	3,54	± 0,68
	400 ppm; 30/26°C	99,58	-4,49	3,74	3,75	± 0,53
	700 ppm; 24/20°C	98,05	-3,12	3,71	3,76	± 0,56
	700 ppm; 30/26°C	99,76	-5,47	3,34	3,34	± 0,85
ARRGR01	400 ppm; 24/20°C	83,16	-0,96	13,42	20,58	± 6,66
	400 ppm; 30/26°C	116,56	-0,60	119,00	73,87	± 102,14
	700 ppm; 24/20°C	91,3	-0,77	25,68	32,92	± 10,10
	700 ppm; 30/26°C	91,47	-0,96	47,54	57,77	± 10,20
PALMS01	400 ppm; 24/20°C	93,71	-1,09	14,52	16,43	± 3,37
	400 ppm; 30/26°C	106,39	-0,95	41,5	36,57	± 5,70
	700 ppm; 24/20°C	99,52	-0,87	29,8	30,13	± 5,65
	700 ppm; 30/26°C	124,3	-0,67	101,68	56,30	± 67,20

C_{50} : dose que causa 50% de controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro X_0 ($\alpha=0,05$).

Além do possível efeito da temperatura sobre a atividade de enzimas detoxificadoras, tanto o aumento da temperatura quanto a maior concentração de CO₂ produziram plantas com maior acúmulo de MMSPA (figura 3). Para essa variável, a interação entre todos os fatores avaliados foi significativa (anexo 1c). Em todas as populações, a MMSPA das testemunhas foi superior nos tratamentos com maior temperatura (30/26°C) e concentração de CO₂. Porém, nas populações suscetíveis SUSP01 e MOSTS01 (figuras 3a e 3b), nos tratamentos em que houve a aspersão de imazethapyr, independentemente da dose, não houve diferença entre os cenários de mudança climática sobre o acúmulo de MMSPA, devido ao alto controle proporcionado pelo herbicida.

Nas populações resistentes ARRGR01 e PALMS01 (figuras 3c e 3d), o maior acúmulo de MMSPA foi observado nas plantas cultivadas sob temperatura de 30/26°C, independentemente da concentração de CO₂. Para a temperatura de 24/20°C, o maior acúmulo de MMSPA ocorreu na concentração de CO₂ de 700 ppm. Em ambas as populações resistentes foram observadas diferenças no acúmulo de MMSPA em doses iguais ou inferiores a 212 g ha⁻¹ de imazethapyr, ou seja, o dobro da dose recomendada. Na dose de 56 g ha⁻¹ de imazethapyr, na população ARRGR01, na concentração de 400 ppm de CO₂ o acúmulo de MMSPA foi de 0,05 e 0,12 g planta⁻¹ para as temperaturas de 24/20°C e 30/26°C, respectivamente. Isso corresponde a um aumento de 58% no acúmulo de MMSPA com aumento da temperatura. Para a concentração de 700 ppm de CO₂, em ambas as temperaturas, o acúmulo de MMSPA foi de 0,43 g planta⁻¹. Da mesma forma, na população PALMS01, na concentração de 400 ppm de CO₂ ocorreu maior acúmulo de MMSPA com o aumento da temperatura na ordem de 25%. Na concentração de 700 ppm, assim como na concentração de 400ppm, não houve diferença no acúmulo de MMSPA com o aumento da temperatura.

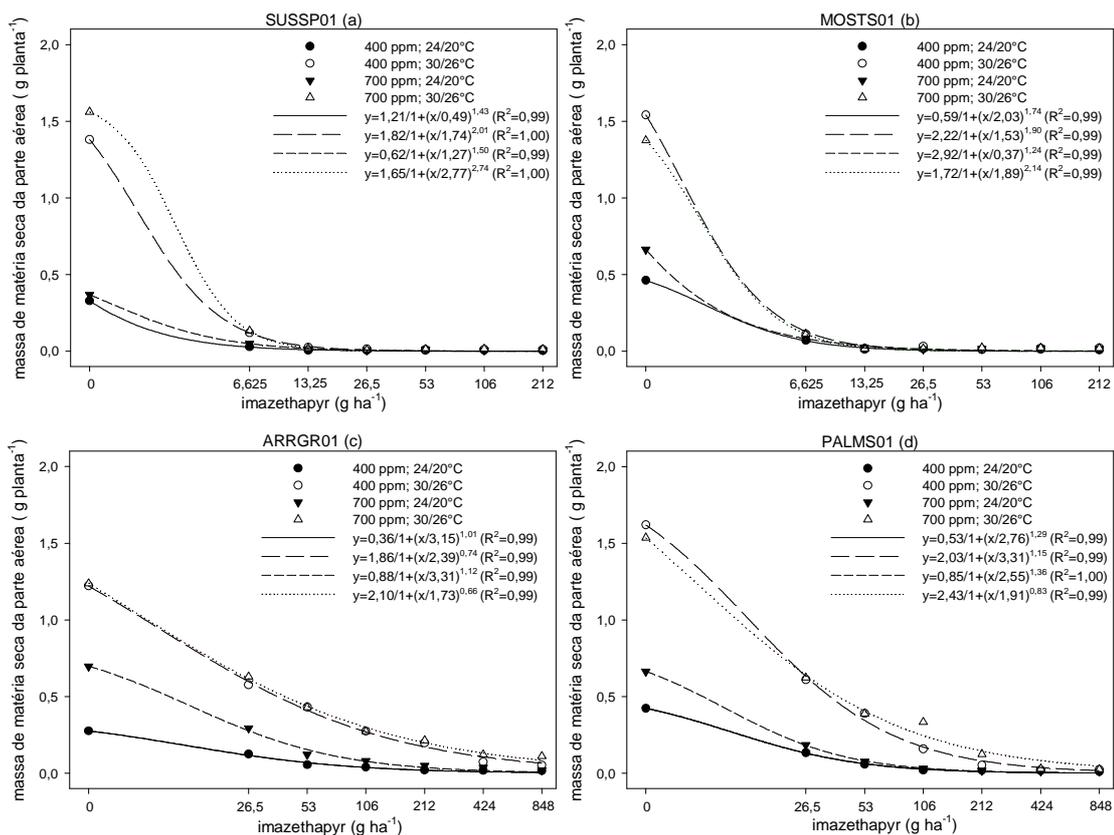


FIGURA 3. Massa de matéria seca da parte aérea de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas duas populações suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e duas populações resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Embora os resultados demonstrem que o efeito do aumento da temperatura foi mais significativo que o aumento da concentração de CO₂, é importante ressaltar que uma das principais consequências do aumento da concentração desse gás na atmosfera é justamente o aumento da temperatura (Tubiello *et al.*, 2007). Dessa forma, com o aumento na concentração de CO₂ atmosférico, além da fertilização causada pelo gás, as plantas C₄ também serão favorecidas pelo aumento da temperatura em consequência do aumento da concentração de CO₂. As projeções indicam que, até o final do século, a concentração de CO₂ deverá ficar entre 730 e 1020 ppm e a temperatura poderá aumentar de 1,1 a 6,4°C (IPCC 2007; Rahmstorf *et al.*, 2012).

TABELA 2. Parâmetros da equação e GR₅₀ para a variável massa de material seca da parte aérea (MMSPA) de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), aos 14 dias após a aspersão do herbicida. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento	MMSPA					
	a	b	X ₀	GR ₅₀	IC	
SUSSP01	400 ppm; 24/20°C	1,21	1,43	0,49	0,49	± 1,86
	400 ppm; 30/26°C	1,82	2,01	1,74	1,74	± 0,78
	700 ppm; 24/20°C	0,62	1,5	1,27	1,27	± 1,46
	700 ppm; 30/26°C	1,65	2,77	2,74	2,74	± 0,84
MOSTS01	400 ppm; 24/20°C	0,47	2,81	4,1	2,03	± 1,51
	400 ppm; 30/26°C	1,99	2,04	1,82	1,53	± 1,55
	700 ppm; 24/20°C	0,71	2,26	3,19	0,37	± 1,71
	700 ppm; 30/26°C	1,39	3,23	3,61	1,89	± 1,67
ARRGR01	400 ppm; 24/20°C	0,36	1,01	3,15	3,15	± 1,53
	400 ppm; 30/26°C	1,86	0,74	2,39	2,39	± 1,04
	700 ppm; 24/20°C	0,88	1,12	3,31	3,31	± 1,19
	700 ppm; 30/26°C	2,1	0,66	1,73	1,73	± 0,79
PALMS01	400 ppm; 24/20°C	0,53	1,29	2,76	2,76	± 0,88
	400 ppm; 30/26°C	2,03	1,15	3,31	3,31	± 0,72
	700 ppm; 24/20°C	0,85	1,36	2,55	2,55	± 0,53
	700 ppm; 30/26°C	2,43	0,83	1,91	1,91	± 1,53

GR₅₀: dose que causa redução de 50% no crescimento das plantas; IC: intervalo de confiança do parâmetro X₀ ($\alpha=0,05$).

Como consequência desse cenário de mudança climática, baseado nos resultados deste estudo, o manejo de plantas de capim-arroz tornar-se-á mais dificultado do ponto de vista da eficiência dos herbicidas em populações resistentes devido ao incremento de metabolização. Isso poderá ocorrer por dois fatores. Em primeiro lugar, a eficiência dos herbicidas diminuirá devido à maior atividade de enzimas detoxificadoras, as quais apresentam maior atividade em temperaturas mais elevadas. Segundo, o maior crescimento das plantas submetidas a cenários de mudança climática tornará as plantas mais vigorosas e, portanto, mais tolerantes aos herbicidas. Ainda, o elevado crescimento dessas plantas provavelmente diminuirá o período ideal de aplicação, uma vez que as plantas atingirão o estágio de aplicação (três folhas) mais rapidamente. Isso também

implicará em reinfestação mais rápida das áreas, o que leva ao aumento no número de aplicações de herbicidas, favorecendo a seleção da resistência.

TABELA 3. Fator de resistência de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) tratadas com imazethapyr em resposta à concentração de CO₂ (400 ppm e 700 ppm) e temperatura (24/20°C e 30/26°C dia/noite), para as variáveis controle aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Tratamento	Fator de resistência (FR)			
	7 DAT	14 DAT	MMSPA	
SUSSP01	400 ppm; 24/20°C	1,00	1,00	1,00
	400 ppm; 30/26°C	0,99	0,93	3,55
	700 ppm; 24/20°C	1,00	1,14	2,59
	700 ppm; 30/26°C	0,93	1,00	5,59
MOSTS01	400 ppm; 24/20°C	0,49	0,94	4,14
	400 ppm; 30/26°C	0,21	0,99	3,12
	700 ppm; 24/20°C	0,29	0,99	0,76
	700 ppm; 30/26°C	0,20	0,88	3,86
ARRGR01	400 ppm; 24/20°C	3,33	5,45	6,43
	400 ppm; 30/26°C	5,73	19,55	4,88
	700 ppm; 24/20°C	4,04	8,71	6,76
	700 ppm; 30/26°C	6,66	15,29	3,53
PALMS01	400 ppm; 24/20°C	2,92	4,35	5,63
	400 ppm; 30/26°C	5,81	9,68	6,76
	700 ppm; 24/20°C	2,86	7,97	5,20
	700 ppm; 30/26°C	7,38	14,90	3,90

5.3.2 Experimento 2- Efeito da concentração de CO₂ e da temperatura sobre o crescimento e parâmetros fisiológicos em plantas de capim-arroz

Os resultados apontam que apenas a interação entre os fatores população e temperatura foi significativa para a variável teor relativo de clorofila (TRC) (anexo 2a). Exceto na população SUSSP01 (figura 4a), em todas as demais populações avaliadas o TRC foi superior nas plantas cultivadas sob temperatura de 24/20°C (figuras 4c, 4d e

4e), independentemente da concentração de CO₂. Ou seja, o efeito da concentração de CO₂ sobre o TRC não foi significativo.

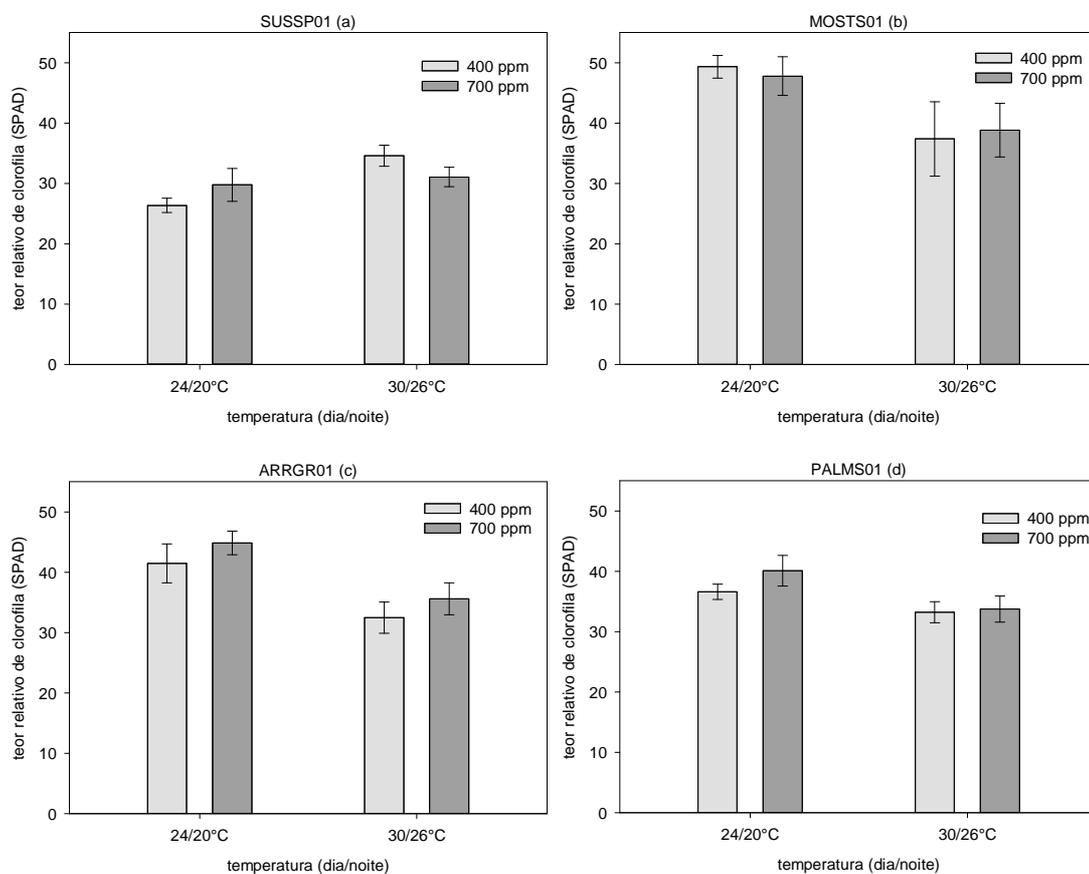


FIGURA 4. Teor relativo de clorofila (TRC) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

As maiores diferenças devido à temperatura foram observadas nas populações MOSTS01 (figura 4b) e ARRGR01 (figura 4c). Nessas populações, os TRCs foram aproximadamente 21% inferiores nas plantas cultivadas sob temperatura de 30/26°C. Na população PALMS01 (figura 4d), a redução no TRC com o aumento da temperatura foi de 12,5%. Os maiores valores foram observados na população MOSTS01, com 48,57 sob temperatura de 24/20°C.

A análise de variância para a variável taxa de transporte de elétrons (ETR) demonstra que todas as interações duplas foram significativas e que a tripla não apresentou significância (anexo 2b). Em todas as populações de capim-arroz avaliadas, a ETR foi inferior em plantas cultivadas no tratamento em que se combinou a temperatura de 24/20°C e concentração de CO₂ de 700 ppm (figura 5). Nas populações suscetíveis SUSSP01 e MOSTS01 (figuras 5a e 5b), as reduções na ETR com o aumento da concentração de CO₂ na temperatura de 24/20°C foram de 39,78% e 70,56%, respectivamente. Para as populações resistentes ARRGR01 e PALMS01 (figuras 5c e 5d), a redução na ETR foi de 43,78% e 71,24%, respectivamente. A população PALMS01, além de ter apresentado a maior redução na ETR a 24/20°C, foi a única em que também houve redução na ETR a 30/26°C com o aumento na concentração de CO₂. Nessa temperatura, a ETR foi de 50,70 e 38,75 nas concentrações de 400 ppm e 700 ppm, respectivamente.

A redução na ETR com o aumento da concentração de CO₂ observado em todas as populações de capim-arroz já foi observada em outras espécies (Hüner *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2004). A ETR é uma medida em tempo real da atividade fotoquímica dos fotossistemas, sendo a variável fotossintética mais sensível às variações das condições ambientais (Pimentel *et al.*, 2011). O cultivo de plantas em condições de alta concentração de CO₂ pode levar à inibição da fotossíntese devido ao acúmulo de carboidratos no citosol (Stitt & Quick, 1989; Foyer *et al.*, 1990). O acúmulo de carboidratos ocorre devido ao fato de que a regulação de outros processos altera os padrões de crescimento das plantas e demanda por fotoassimilados devido a limitações ambientais, tal como a temperatura (Ainsworth *et al.*, 2004). Dessa forma, conforme observado neste estudo, na combinação de temperatura baixa (24/20°C) e alta

concentração de CO₂ (700 ppm), ocorre acúmulo de fotoassimilados, inibição do processo de fotossíntese e redução na ETR.

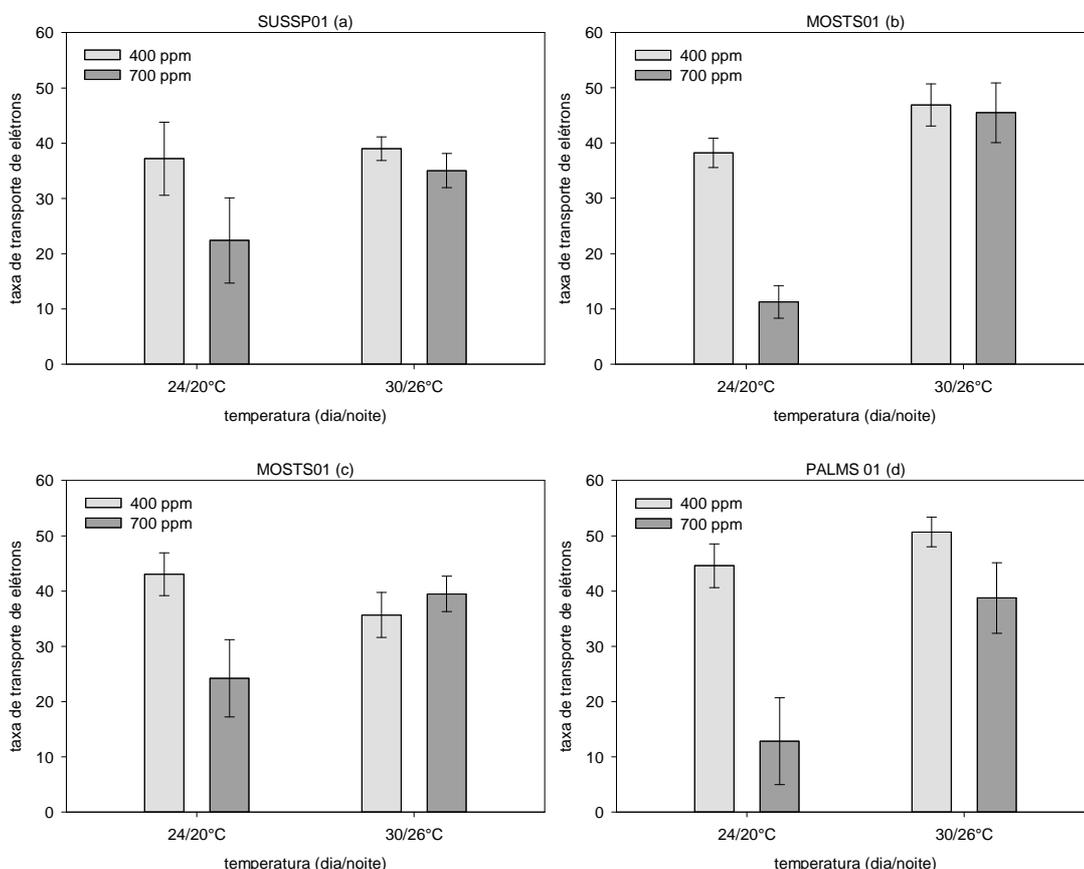


FIGURA 5. Taxa de transporte de elétrons (ETR) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRG01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

Para a variável número de perfilhos por planta (NPP), a interação foi significativa apenas entre os fatores concentração de CO₂ e temperatura (anexo 2c). Na temperatura 30/26 °C não houve diferença entre as concentrações de CO₂ (figura 6). No entanto, sob temperatura de 24/20°C, a fertilização com CO₂ ocasionou aumento no NPP em todas as populações avaliadas. O maior NPP foi observado na população MOSTS01 (figura 6b), com valores superiores a nove perfilhos por planta. O menor NPP foi observado na população SUSSP01 (figura 6 a), com apenas três perfilhos por planta no cenário de 24/20°C e 400 ppm de CO₂. Portanto, é possível afirmar que tanto

o incremento na concentração de CO₂ quanto o aumento da temperatura geram plantas de capim-arroz com maior número de perfilhos.

O maior NPP (figura 6) observado em plantas de capim-arroz cultivadas nos tratamentos que combinaram alta temperatura (30/26°C) com alta concentração de CO₂, ou alta concentração de CO₂ na temperatura mais baixa, coincide com os tratamentos que proporcionaram maior acúmulo de MMSPA (figura 7). Isso pode ser explicado pelo fato de que o NPP é o principal componente da produção de MMSPA (Sugiyama, 1995). O processo de perfilhamento é regulado por fatores genéticos e ambientais (Kim *et al.*, 2010). Tanto o aumento na concentração de CO₂ quanto o da temperatura podem causar o aumento no perfilhamento de poáceas (Morison & Lawflor, 1999; Baker & Allen, 1993). Nessas condições, ocorre o maior acúmulo de fotoassimilados, o qual é um dos principais fatores que estimulam a emissão de novos perfilhos (Kim *et al.*, 2010).

As ANOVAs dos dados referentes ao acúmulo de MMSPA e MMSR revelam a ocorrência de interação tripla entre os fatores avaliados (anexos 2d e 2f). Independentemente da população de capim-arroz avaliada, o acúmulo de MMSPA foi superior em plantas cultivadas sob a temperatura de 30/26°C (figura 7). Nessa temperatura, o aumento na concentração de CO₂ não proporcionou maior crescimento das plantas. No entanto, na temperatura de 24/20°C, exceto na população SUSSP01 (figura 7a), todas as demais populações apresentaram maior acúmulo de MMSPA na maior concentração de CO₂ (figuras 7b, 7c e 7d). Em relação ao efeito médio dos fatores principais, as populações MOSTS01 e PALMS01 acumularam maiores quantidades de MMSPA, revelando não haver relação entre a resistência ao herbicida imazethapyr e o crescimento sob cenários de mudança climática, na ausência do herbicida. Para o fator concentração de CO₂, não houve diferença entre os níveis

avaliados. Contudo, para o fator temperatura, as plantas acumularam, em média, 67% a mais de MMSPA quando cultivadas em temperatura de 30/26°C. Na figura 9 é possível observar o efeito da temperatura e concentração de CO₂ sobre o crescimento da parte aérea e raízes das plantas.

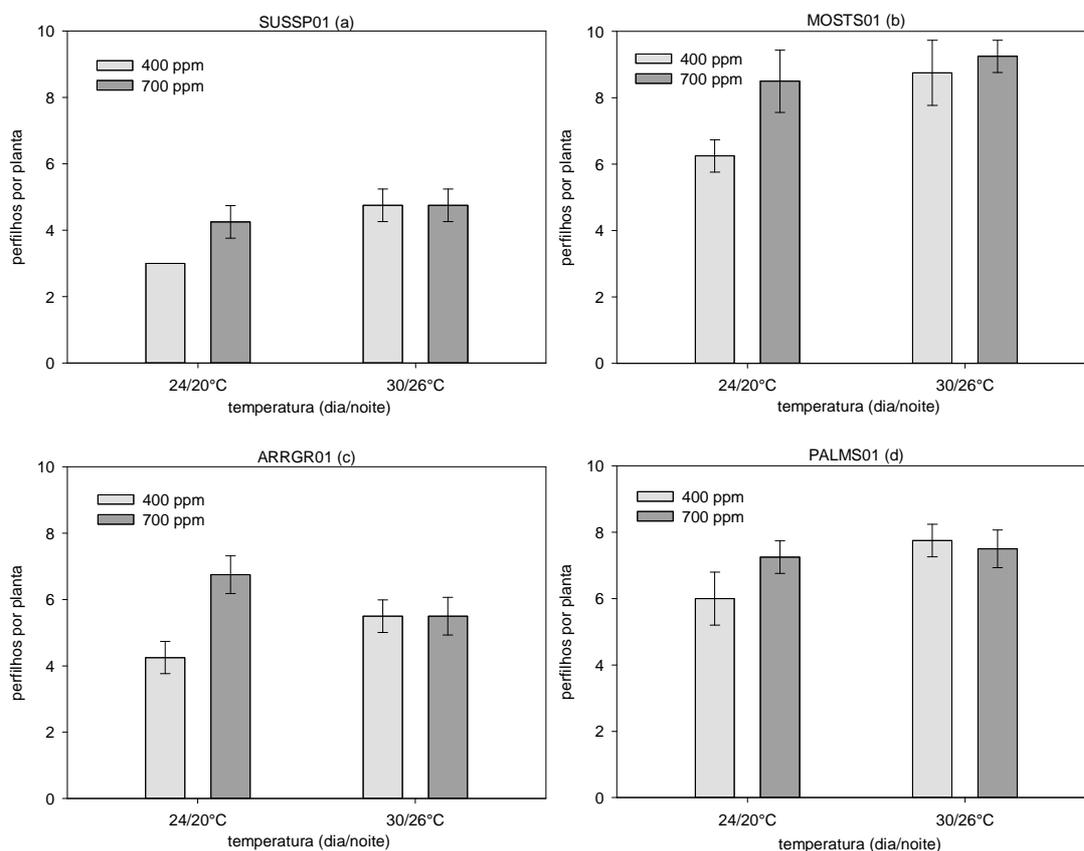


FIGURA 6. Número de perfilhos por planta (NPP) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

O teor relativo de clorofila (TRC) (figura 4) foi inversamente proporcional ao acúmulo de MMSPA (figura 7). Em condições de temperatura mais elevada (30/26°C), o acúmulo de MMSPA foi superior e o TRC foi inferior. O TRC está diretamente ligado à disponibilidade de nitrogênio (N), uma vez que este elemento é um dos principais componentes da molécula de clorofila. Com o aumento da taxa fotossintética e os maiores acúmulos de fotoassimilados e MMSPA, a demanda por N aumenta, causando

deficiência de N nas folhas (Kim *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2015). Dessa forma, pode-se inferir que a demanda por nutrientes por plantas de capim-arroz será superior em condições de temperatura e concentração de CO₂ elevadas.

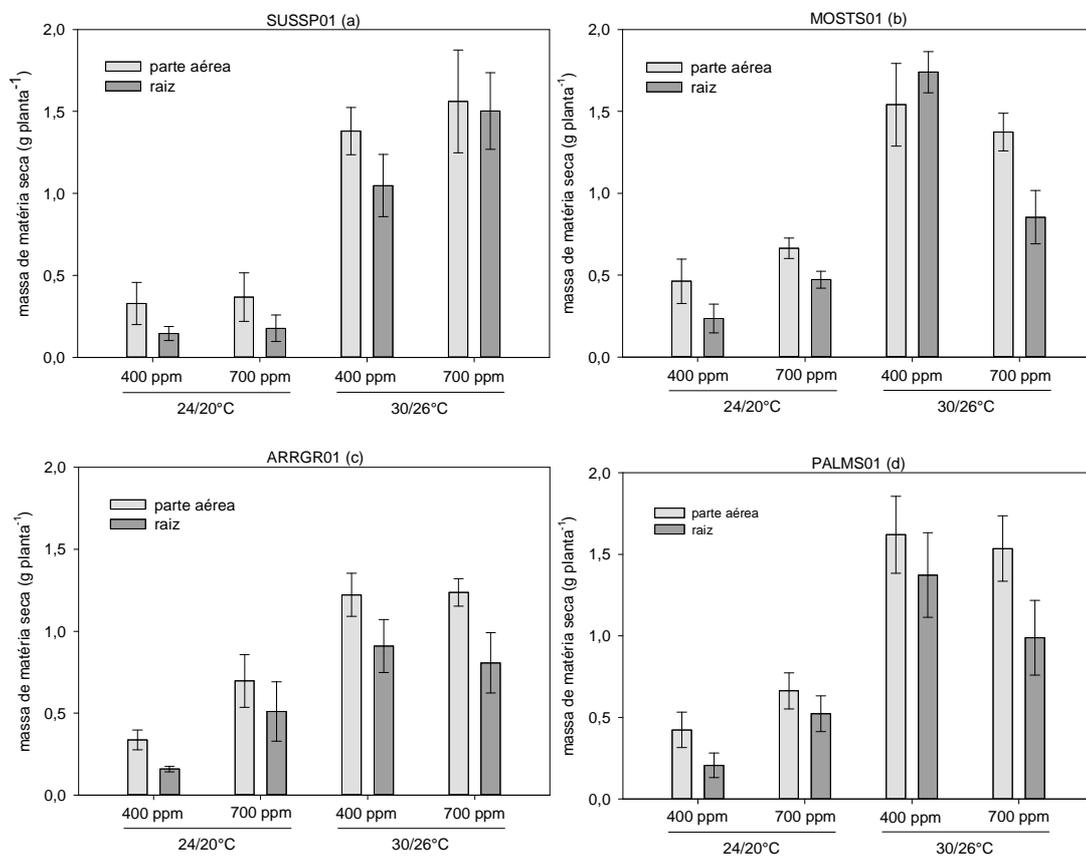


FIGURA 7. Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa de matéria seca de raiz (MMSR) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

O efeito dos tratamentos em relação ao acúmulo de MMSR foi semelhante ao observado para a variável MMSPA. O crescimento radicular foi superior em plantas cultivadas sob temperatura de 30/26°C (figura 7). Contudo, nessa temperatura, a maior concentração de CO₂ (700 ppm) causou redução no acúmulo de MMSR nas populações MOSTS01 e PALMS01 (figuras 7b e 7d). Na temperatura de 24/20°C, assim como para

a MMSPA, exceto para a população SUSSP01, o aumento na concentração de CO₂ gerou maior crescimento radicular.

A ANOVA para a relação parte aérea/raiz (PA/R) indica a ocorrência de interação tripla entre os fatores avaliados (anexo 2g). Em plantas cultivadas em temperatura de 24/20°C, exceto para a população SUSSP01 (figura 8a), a maior concentração de CO₂ (700 ppm) resultou em menor relação PA/R. Esses resultados são em decorrência do maior crescimento radicular das plantas de capim-arroz cultivadas a 700 ppm de CO₂ (figura 7). Embora na temperatura de 24/20°C o aumento na concentração de CO₂ tenha ocasionado maior acúmulo de MMSPA, a proporção no aumento do acúmulo de MMSR foi superior. Na média entre as três populações em que concentração de CO₂ teve efeito, o acúmulo de MMSPA foi 44,39% superior nas plantas cultivadas a 700 ppm. Contudo, o acúmulo de MMSR nesse cenário foi 62,55% superior, explicando a menor relação PA/R observada.

O maior crescimento radicular observado nos cenários de altas temperaturas e/ou concentração de CO₂ fazem com que, nessas condições, a capacidade competitiva do capim-arroz aumente. Com o sistema radicular mais robusto, o volume de solo explorado é maior, competindo com as culturas por água e nutrientes. O arroz-irrigado, uma das principais culturas infestadas pelo capim-arroz, é uma planta C₃, a qual seria beneficiada com o aumento da concentração de CO₂ atmosférico. No entanto, o aumento da temperatura pode anular o efeito positivo da fertilização com CO₂ em plantas C₃, uma vez que a temperatura ótima para a fotossíntese em plantas C₃ é de aproximadamente de 20-25°C. Contudo, em plantas C₄, o intervalo de temperatura em que a atividade fotossintética é maior é de 30-40°C (Yamori *et al.*, 2014). Dessa forma, sendo o capim-arroz uma planta C₄, os resultados observados neste experimento, em

que as plantas apresentaram maior crescimento da parte aérea e das raízes na maior temperatura (30/26°C), corroboram com os resultados presentes na literatura.

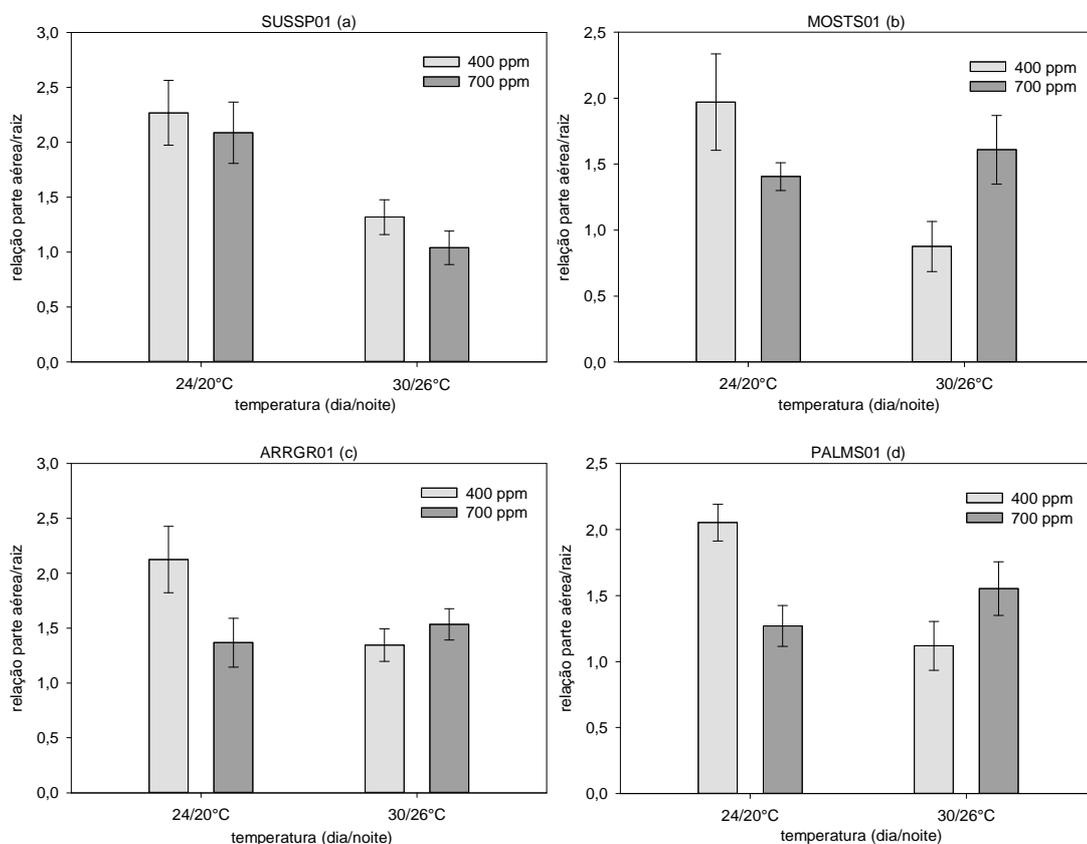


FIGURA 8. Relação parte aérea/raiz (PA/R) de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (a) e MOSTS01 (b)) e resistentes (ARRGR01 (c) e PALMS01 (d)) ao herbicida imazethapyr, em resposta à concentração de CO₂ e temperatura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

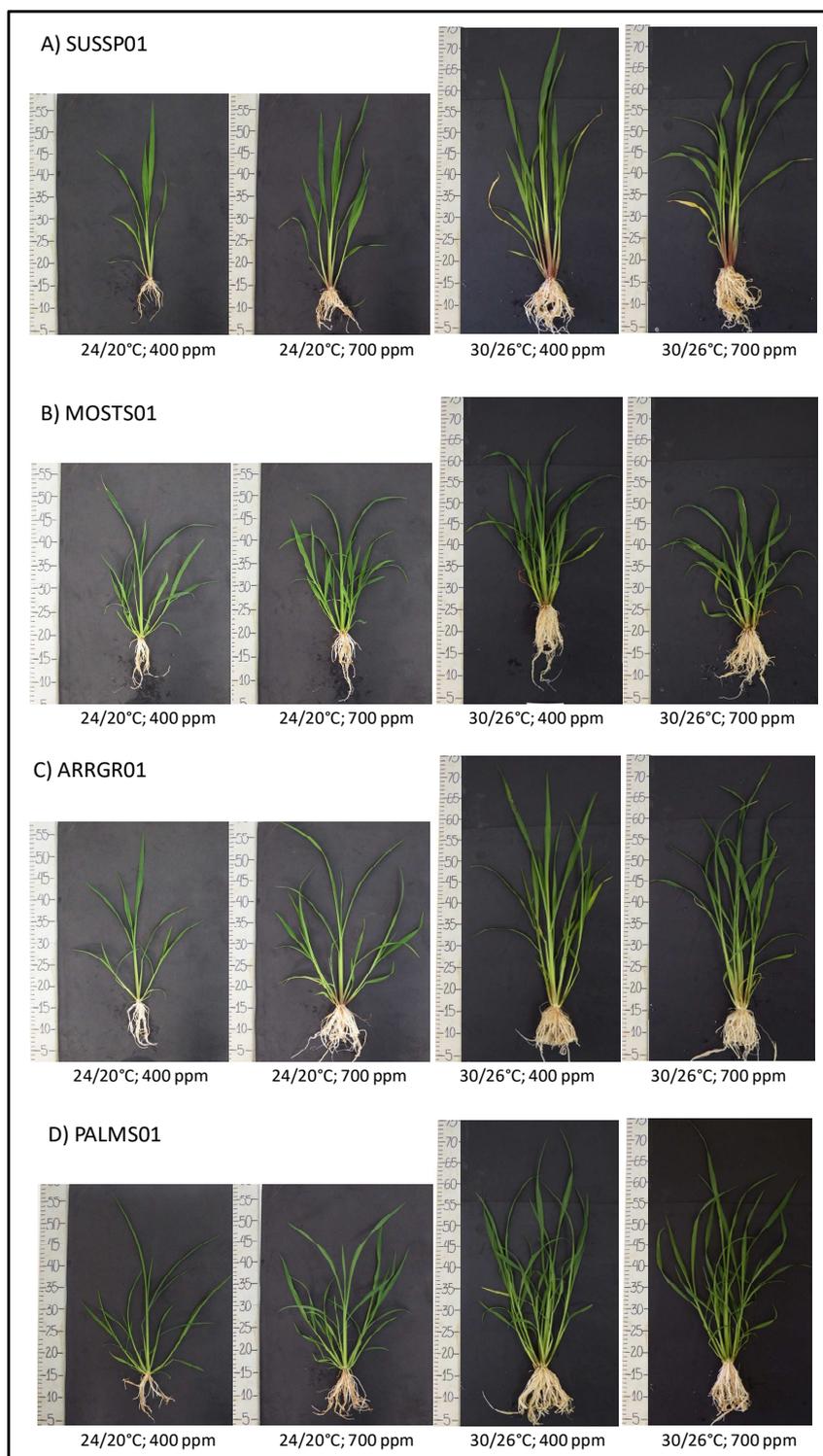


FIGURA 9. Efeito da temperatura (24/20°C e 30/26°C) e concentração de CO₂ (400 e 700 ppm) sobre o crescimento de plantas de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) suscetíveis (SUSSP01 (A) e MOSTS01 (B)) e resistentes (ARRGR01 (C) e PALMS01 (D)) ao herbicida imazethapyr. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2016.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cenários de mudança simulados neste trabalho indicam que o controle de plantas de capim-arroz com imazethapyr poderá ser favorecido em áreas com presença de plantas suscetíveis ao herbicida. No entanto, em plantas resistentes, em que há o envolvimento de enzimas detoxificadoras (P450), o controle foi inferior em condições de temperatura elevada (30/26°C) ou alta concentração de CO₂ (700 ppm). O aumento da temperatura influenciou de maneira mais acentuada a tolerância de plantas de capim-arroz ao herbicida imazethapyr em comparação com o aumento da concentração de CO₂. A maior concentração de CO₂ apresentou maior efeito quando combinada com a menor temperatura avaliada (24/20°C). Com o aumento da temperatura de 24/20°C para 30/26°C, o fator de resistência em plantas cultivadas sob 400 ppm aumentou 72% e 55% para as populações ARRGR01 e PALMS01, respectivamente. Quando cultivadas em 700 ppm, o aumento do FR foi de 43% (ARRGR01) e 46,5% (PALMS01) em resposta ao aumento da temperatura.

Além de, possivelmente, favorecer a maior atividade de enzimas detoxificadoras, o aumento da temperatura causou o maior acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), tornando as plantas mais vigorosas. Plantas cultivadas na concentração de 700 ppm de CO₂ e temperatura de 30/26°C apresentaram maior perfilhamento, favorecendo o acúmulo de MMSPA. Além do maior crescimento da parte aérea, os cenários de mudança climática também favoreceram o crescimento radicular das plantas e o acúmulo de massa de matéria seca de raiz (MMSR).

As variáveis fotossintéticas teor relativo de clorofila (TRC) e taxa de transporte de elétrons (ETR) também apresentaram respostas ao aumento de temperatura e concentração de CO₂. O TRC foi inversamente proporcional ao acúmulo de MMSPA,

ao passo que a menor ETR foi observada em plantas cultivadas sob a temperatura de 24/20°C e 700 ppm de CO₂.

De maneira geral, pode-se concluir que tanto o aumento da concentração de CO₂ quanto da temperatura aumentarão o crescimento a tolerância de capim-arroz ao herbicida imazethapyr.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D. et al. Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. especial, p. 993-1003, 2010.

AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 fev. 2016.

AINSWORTH, E. A. et al. Testing the “source-sink” hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated [CO₂] with single gene substitutions in Glycine max. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 85-94, 2004.

BAKER, J. T.; ALLEN, L. H. Jr. Contrasting crop species responses to CO₂ and temperature: Rice, soybean, and citrus. **Vegetatio**, London, v. 104, n. 1, p. 239-260, 1993.

BLUMENTHAL, D. M. et al. Invasive forb benefits from water savings by native plants and carbon fertilization under elevated CO₂ and warming. **New Phytologist**, Cambridge, v. 200, n. 4, p. 1156-1165, 2013.

CLEMENTS, D. R.; DITOMMASO, A. Climate change and weed adaptation: can evolution of invasive plants lead to greater range expansion than forecasted? **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 227-240, 2011.

DAVIS, A. S.; AINSWORTH, E. A. Weed interference with field-grown soyabean decreases under elevated [CO₂] in a FACE experiment. **Weed Research**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 277-285, 2012.

DOWNEY, P. O. et al. Does the tolerance of weeds to herbicide change with elevated levels of CO₂? In: AUSTRALASIAN WEEDS CONFERENCE, 18., Melbourne, Victoria, Australia, 2012. [**Proceedings**]. Melbourne, Victoria, Australia, 2012.

DUKES, J. S. et al. Strong response of an invasive plant species (*Centaurea solstitialis* L.) to global environmental changes. **Ecological Applications**, Tempe, v. 21, n. 6, p. 1887-1894, 2011.

FOYER, C. et al. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 83-100, 1990.

GODAR, A. S. et al. Physiological and molecular mechanisms of differential sensitivity of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to mesotrione at varying growth temperatures. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. 1-17, 2015.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 19 jan. 2016.

HÜNER, N. P. A. et al. Potential for increased photosynthetic performance and crop productivity in response to climate change: role of CBFs and gibberellic acid. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2014.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). **Climate change 2014**: synthesis report. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2014. 80 p.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). **Climate Change 2007**: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK and New York: Cambridge University Press. 2007. 996 p.

KENT, L. M. et al. Influence of ammonium sulfate, imazapyr, temperature, and relative humidity on the absorption and translocation of imazethapyr. **Weed Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p. 412-416, 1991.

KIM, H. K. et al. Regulation of tillering in sorghum: environmental effects. **Annals of Botany**, London, v. 106, n. 1, p. 57-67, 2010.

KIM, H. Y. et al. Dry matter and nitrogen accumulation and partitioning in rice (*Oryza sativa* L.) exposed to experimental warming with elevated CO₂. **Plant and Soil**, The Hague, v. 342, n. 1-2, p. 59-71, 2011.

KOEPPE, M. K. et al. Basis of selectivity of the herbicide rimsulfuron in maize. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 66, n.3, p.170-181, 2000.

LEEGOOD, R. C. C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 369, p. 581-590, 2002.

LONG, S. P. et al. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 591-628, 2004.

LOS, D. A.; MURATA, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1666, n. 1-2, p. 142-157, 2004.

MAHAN, J.R. et al. Thermal dependence of enzyme function and inhibition: implications for herbicide efficacy and tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 2, p. 187-195, 2004.

MANEA, A. et al. Exotic C₄ grasses have increased tolerance to glyphosate under elevated carbon dioxide. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 1, p. 28-36, 2011.

MATZENBACHER, F. O. et al. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015.

MCDONALD, A. et al. Climate change and the geography of weed damage: Analysis of U.S. maize systems suggests the potential for significant range transformations **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 131-140, 2009.

MORISON, J. I. L.; LAWLOR, D. W. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 659-682, 1999.

NATIONAL OCEANIC & ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). Earth System Research Laboratory – Global Monitoring Division. **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**. Recent Global CO₂. Fevereiro/2016. (Obtido via base de dados NOAA. 2016. Online). Disponível em: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html#global>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

OLSON, B. L. S. et al. Efficacy and metabolism of mon 37500 in *Triticum aestivum* and weedy grass species as affected by temperature and soil moisture. **Weed Science**, Champaign, v. 48, n. 5, p. 541-548, 2000.

PETERS, K. et al. Impact of climate change on weeds in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 4, p. 707-721, 2014.

PETERS, K.; GEROWITT, B. Important maize weeds profit in growth and reproduction from climate change conditions represented by higher temperatures and reduced humidity. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 87, n. 1, p. 234-242, 2014.

PIMENTEL, C. et al. Características fotossintéticas de *Phaseolus vulgaris* L. **Hoehnea**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 273-279, 2011.

POLGE, N. D.; BARRETT, M. Temperature effects on imazaquin soil bioavailability, uptake, and metabolism in corn (*Zea mays*). **Weed Science**, Champaign, v. 45, n. 2, p. 198-204, 1997.

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

RAHMSTORF, S. et al. Comparing climate projections to observations up to 2011. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2012.

SHEPPARD, C. S.; STANLEY, M, C. Does elevated temperature and doubled CO₂ increase growth of three potentially invasive plants? **Invasive Plant Science and Management**, Lawrence, v. 7, n. 2, p. 237-246, 2014.

SOLOMON, S. et al. **Climate change 2007: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 996 p.

STITT, M.; QUICK, W. P. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 77, n. 4, p. 633-641, 1989.

SUGIYAMA, S. The relationship between growth and development of vegetative shoots in genotypes of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 6, p. 553-558, 1995.

THUILLER, W. et al. Interactions between environment, species traits, and human uses describe patterns of plant invasions. **Ecology**, New York, v. 87, n. 7, p. 1755-1769, 2006.

TUBIELLO, F. N., et al. Crop and pasture response to climate change. **PNAS**, Washington, v. 104, n. 50, p. 19686-19690, 2007.

WALTER, L. C. et al. Mecanismos de aclimação das plantas à elevada concentração de CO₂. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p. 1564-1571, 2015.

WANG, R. L. et al. Elevated temperature may accelerate invasive expansion of the liana plant *Ipomoea cairica*. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 574-580, 2011.

YAMORI, W. Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation, **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 119, n. 1-2, p. 101-17, 2014.

YU, J. et al. Physiological effects of temperature on turfgrass tolerance to amicarbazone. **Pest Management Science**, London, v. 71, n. 4, p. 571-578, 2015.

ZISKA, L. H. et al. Changes in biomass and root:shoot ratio of field-grown Canada thistle (*Cirsium arvense*), a noxious, invasive weed, with elevated CO₂: implications for control with glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 4, p. 584-588, 2004.

ZISKA, L. H. et al. Future atmospheric carbon dioxide concentrations may increase tolerance to glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 47, n. 5, p. 608-615, 1999.

ZISKA, L. H.; McConnells, L. L. Climate change, carbon dioxide, and pest biology: monitor, mitigate, manage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 64, n. 1, p. 6-12, 2016.

ZISKA, L. The impact of elevated CO₂ on yield loss from a C₃ and C₄ weed in field-grown soybean. **Global Change Biology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 899-905, 2000.

6 CONCLUSÕES GERAIS

As populações resistentes de capim-arroz ARRGR01 e PALMS01 apresentam o incremento de metabolização como mecanismo de resistência ao herbicida imazethapyr. A resistência foi parcialmente revertida com a aspersão prévia de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO). De maneira oposta, a aspersão prévia de anidrido naftálico atuou como indutor da resistência ao herbicida.

A análise da estabilidade de genes referência demonstrou que os genes *18S* e *actina* apresentaram-se mais estáveis em plantas de capim-arroz submetidas ao estresse pelo herbicida imazethapyr.

Os genes *CYP81A6* e *GSTF1* estão envolvidos no mecanismo de resistência a imazethapyr nas populações avaliadas neste estudo. O gene *CYP81A6*, o qual codifica para uma enzima detoxificadora (citocromo P450 monooxigenase), apresentou maiores níveis de expressão relativa nas populações de capim-arroz resistentes ao imazethapyr. Além disso, a aspersão do herbicida induziu a expressão desse gene. De forma semelhante, o gene *GSTF1*, o qual codifica para uma enzima glutationa S-transferase, também apresentou maiores níveis de transcritos nas populações resistentes, sobretudo quando as plantas foram tratadas com imazethapyr. Nas populações resistentes foi observada a maior expressão relativa do gene *eIF4B*, o qual codifica para um fator iniciador de tradução. Esse gene, juntamente com os genes *CYP81A6* e *GSTF1*, pode

estar envolvido no processo de resistência ao imazethapyr nas populações avaliadas neste estudo.

Os aumentos da temperatura e da concentração de CO₂ tornaram as plantas resistentes ainda mais insensíveis ao herbicida imazethapyr. Plantas cultivadas em temperaturas mais elevadas (30/26°C) e maior concentração de CO₂ (700 ppm) apresentaram maior acúmulo de massa de matéria seca, tanto na parte aérea quanto nas raízes, tornando-as mais vigorosas.

7 ANEXOS

CAPÍTULO 2

Experimento 1

Anexo 1a- ANOVA controle aos 7 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	6,20	2,06	833,29	p < 0,01
Inibidor (F2)	2	0,14	0,07	29,01	p < 0,01
Dose (F3)	6	37,31	6,21	2504,39	-
Int. F1xF2	6	0,16	0,02	10,96	p < 0,01
Int. F1xF3	18	1,85	0,10	41,50	p < 0,01
Int. F2xF3	12	0,19	0,01	6,49	p < 0,01
Int. F1xF2xF3	36	0,15	0,004	1,68	p < 0,05
Tratamentos	83	46,02	0,55	223,32	p < 0,01
Resíduo	252	0,62	0,002		
Total	335	46,65			

Anexo 1b- ANOVA controle aos 14 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	8,03	2,67	294,20	p < 0,01
Inibidor (F2)	2	0,08	0,04	4,53	p < 0,05
Dose (F3)	6	80,50	13,41	1473,08	-
Int. F1xF2	6	0,35	0,05	6,54	p < 0,01
Int. F1xF3	18	6,08	0,33	37,14	p < 0,01
Int. F2xF3	12	0,40	0,03	3,73	p < 0,01
Int. F1xF2xF3	36	0,79	0,02	2,42	p < 0,01
Tratamentos	83	96,28	1,16	127,35	p < 0,01
Resíduo	252	2,29	0,009		
Total	335	98,57			

Anexo 1c- ANOVA controle aos 21 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	7,98	2,66	228,70	p < 0,01
Inibidor (F2)	2	0,11	0,05	4,79	p < 0,01
Dose (F3)	6	92,47	15,41	1323,74	-
Int. F1xF2	6	0,34	0,05	4,86	p < 0,01
Int. F1xF3	18	6,92	0,38	33,05	p < 0,01
Int. F2xF3	12	0,30	0,02	2,20	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	36	0,76	0,02	1,83	p < 0,01
Tratamentos	83	108,91	1,31	112,70	p < 0,01
Resíduo	252	2,93	0,011		
Total	335	111,84			

Anexo 1d- ANOVA massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	6,34	2,11	31,91	p < 0,01
Inibidor (F2)	2	0,29	0,14	2,19	ns
Dose (F3)	6	156,10	26,01	392,83	-
Int. F1xF2	6	3,15	0,52	7,94	p < 0,01
Int. F1xF3	18	14,70	0,81	12,33	p < 0,01
Int. F2xF3	12	0,30	0,02	0,37	ns
Int. F1xF2xF3	36	3,83	0,10	1,61	p < 0,05
Tratamentos	83	184,73	2,22	33,60	p < 0,01
Resíduo	252	16,68	0,06		
Total	335	201,42			

Experimento 2

Anexo 2a- ANOVA controle aos aos 7 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	2,47	0,82	137,98	p < 0,01
Indutor (F2)	1	0,30	0,30	51,48	p < 0,01
Dose (F3)	6	16,96	2,82	472,91	-
Int. F1xF2	3	0,04	0,01	2,62	ns
Int. F1xF3	18	0,75	0,04	6,97	p < 0,01
Int. F2xF3	6	0,05	0,009	1,61	ns
Int. F1xF2xF3	18	0,16	0,008	1,48	ns
Tratamentos	55	20,76	0,37	63,14	p < 0,01
Resíduo	112	0,66	0,005		
Total	167	21,43			

Anexo 2b- ANOVA controle aos 14 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	4,95	1,65	138,64	p < 0,01
Indutor (F2)	1	0,22	0,22	18,62	p < 0,01
Dose (F3)	6	31,56	5,26	442,04	-
Int. F1xF2	3	0,21	0,07	6,01	p < 0,01
Int. F1xF3	18	1,33	0,07	6,23	p < 0,01
Int. F2xF3	6	0,05	0,009	0,78	ns
Int. F1xF2xF3	18	0,17	0,009	0,83	ns
Tratamentos	55	38,52	0,70	58,85	p < 0,01
Resíduo	112	1,33	0,01		
Total	167	39,85			

Anexo 2c- ANOVA controle aos 21 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	7,17	2,39	144,85	p < 0,01
Indutor (F2)	1	0,04	0,04	2,88	ns
Dose (F3)	6	35,81	5,96	361,63	-
Int. F1xF2	3	0,04	0,01	0,98	ns
Int. F1xF3	18	2,64	0,14	8,91	p < 0,01
Int. F2xF3	6	0,06	0,01	0,62	ns
Int. F1xF2xF3	18	0,21	0,01	0,71	ns
Tratamentos	55	46,01	0,83	50,67	p < 0,01
Resíduo	112	1,84	0,01		
Total	167	47,85			

Anexo 2d- ANOVA massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	13,01	4,33	106,55	p < 0,01
Indutor (F2)	1	0,16	0,16	4,04	p < 0,05
Dose (F3)	6	111,59	18,59	456,78	-
Int. F1xF2	3	0,22	0,07	1,82	ns
Int. F1xF3	18	7,11	0,39	9,71	p < 0,01
Int. F2xF3	6	0,21	0,03	0,88	ns
Int. F1xF2xF3	18	0,56	0,03	0,77	ns
Tratamentos	55	132,89	2,41	59,34	p < 0,01
Resíduo	112	4,56	0,04		
Total	167	137,45			

Experimento 3

Anexo 3a- ANOVA concentração de imazethapyr

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
Tratamentos	4	0,22	0,05	913,38	p < 0,01
Resíduo	5	0,003	0,00006		
Total	9	0,22			

Experimento 4

Anexo 4a- ANOVA controle aos 7 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	1	20,53	20,53	126,09	p < 0,01
Dose de malathion (F2)	7	2,93	0,41	2,57	-
Int. F1xF2	7	0,22	0,03	0,20	p < 0,05
Tratamentos	15	23,69	1,57	9,7	p < 0,01
Resíduo	48	7,81	0,16		
Total	63	31,51			

Anexo 4b- ANOVA controle aos 14 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	1	67,64	67,64	299,57	p < 0,01
Dose de malathion (F2)	7	1,80	0,25	1,13	-
Int. F1xF2	7	0,58	0,08	0,37	ns
Tratamentos	15	70,03	4,66	20,67	p < 0,01
Resíduo	48	10,83	0,22		
Total	63	80,87			

Anexo 4c- ANOVA massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	1	7,05	7,05	74,49	p < 0,01
Dose de malathion (F2)	7	0,69	0,09	1,05	-
Int. F1xF2	7	0,65	0,09	0,98	ns
Tratamentos	15	8,40	0,56	5,91	p < 0,01
Resíduo	48	4,54	0,09		
Total	63	12,95			

CAPÍTULO 4

Experimento 1

Anexo 1a- ANOVA controle aos 7 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	44,34	14,78	411,55	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	0,23	0,23	6,39	p < 0,01
Temperatura (F3)	1	8,19	8,19	228,10	p < 0,05
Dose imazethapyr (F4)	6	4320,60	720,10	20048,04	-
Int. F1xF2	3	2,11	0,70	19,58	p < 0,05
Int. F1xF3	3	25,67	8,55	238,19	p < 0,05
Int. F1xF4	18	9,51	0,53	14,72	p < 0,05
Int. F2xF3	1	0,10	0,11	3,04	ns
Int. F2xF4	6	0,43	0,07	2,02	ns
Int. F3xF4	6	8,99	1,50	41,73	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	0,30	0,10	2,81	p < 0,01
Int. F1xF2xF4	18	1,13	0,06	1,75	p < 0,01
Int. F1xF3xF4	18	8,86	0,49	13,70	p < 0,05
Int. F2xF3xF4	6	0,20	0,03	0,95	ns
Int. F1xF2xF3xF4	18	1,34	0,07	2,08	p < 0,05
Tratamentos	111	4432,05	39,93	1111,63	p < 0,05
Resíduo	336	12,06	0,03		
Total	447	4444,12			

Anexo 1b- ANOVA controle aos 14 DAT

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	185,35	61,78	796,93	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	1,41	1,41	18,20	p < 0,05
Temperatura (F3)	1	2,04	2,04	26,32	p < 0,05
Dose imazethapyr (F4)	6	4688,50	781,41	10079,23	-
Int. F1xF2	3	2,49	0,83	10,74	p < 0,05
Int. F1xF3	3	8,10	2,70	34,83	p < 0,05
Int. F1xF4	18	92,37	5,13	66,19	p < 0,05
Int. F2xF3	1	0,53	0,53	6,85	p < 0,05
Int. F2xF4	6	1,94	0,32	4,18	p < 0,05
Int. F3xF4	6	3,66	0,61	7,87	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	0,33	0,11	1,44	ns
Int. F1xF2xF4	18	2,87	0,16	2,05	p < 0,05
Int. F1xF3xF4	18	14,76	0,82	10,58	p < 0,05
Int. F2xF3xF4	6	1,55	0,26	3,34	p < 0,05
Int. F1xF2xF3xF4	18	1,39	0,08	1,00	ns
Tratamentos	111	5007,33	45,11	581,87	p < 0,05
Resíduo	336	26,04	0,08		
Total	447	5033,38			

Anexo 1c- ANOVA massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	1,58	0,53	27,14	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	0,18	0,18	9,46	p < 0,05
Temperatura (F3)	1	5,07	5,07	260,89	p < 0,05
Dose imazethapyr (F4)	6	40,64	6,77	348,19	-
Int. F1xF2	3	0,05	0,01	0,82	ns
Int. F1xF3	3	0,59	0,19	10,19	p < 0,05
Int. F1xF4	18	1,71	0,09	4,88	p < 0,05
Int. F2xF3	1	0,002	0,002	0,11	ns
Int. F2xF4	6	0,30	0,05	2,57	p < 0,01
Int. F3xF4	6	8,73	1,45	74,82	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	0,02	0,006	0,32	ns
Int. F1xF2xF4	18	0,05	0,002	0,14	p < 0,05
Int. F1xF3xF4	18	1,21	0,06	3,45	p < 0,05
Int. F2xF3xF4	6	0,04	0,006	0,33	ns
Int. F1xF2xF3xF4	18	0,15	0,008	0,44	p < 0,01
Tratamentos	111	60,35	0,54	27,94	p < 0,05
Resíduo	336	6,54	0,019		
Total	447	66,89			

Experimento 2

Anexo 2a- ANOVA teor relativo de clorofila (TRC)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	1383,13	461,04	54,64	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	25,88	25,88	3,07	ns
Temperatura (F3)	1	389,57	389,57	46,16	p < 0,05
Int. F1xF2	3	33,19	11,06	1,31	ns
Int. F1xF3	3	563,67	187,89	22,26	p < 0,05
Int. F2xF3	1	11,81	11,81	1,40	ns
Int. F1xF2xF3	3	51,20	17,07	2,02	ns
Tratamentos	15	2458,47	163,89	19,42	p < 0,05
Resíduo	48	405,04	8,44		
Total	63	2863,51			

Anexo 2b- ANOVA taxa de transporte de elétrons (ETR)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	90,38	30,12	1,18	ns
[CO ₂] (F2)	1	2366,82	2366,82	92,72	p < 0,05
Temperatura (F3)	1	2803,70	2803,70	109,84	p < 0,05
Int. F1xF2	3	770,58	256,86	10,06	p < 0,05
Int. F1xF3	3	490,13	163,37	6,40	p < 0,05
Int. F2xF3	1	1554,33	1554,33	60,89	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	121,99	40,66	1,59	ns
Tratamentos	15	8197,94	546,53	21,41	p < 0,05
Resíduo	48	1225,18	25,52		
Total	63	9423,12			

Anexo 2c- ANOVA número de perfilhos por planta (NPP)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	149,37	49,79	52,52	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	14,06	14,06	14,83	p < 0,05
Temperatura (F3)	1	14,06	14,06	14,83	p < 0,05
Int. F1xF2	3	2,31	0,77	0,81	ns
Int. F1xF3	3	5,56	1,85	1,95	ns
Int. F2xF3	1	12,25	12,25	12,92	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	0,87	0,29	0,31	ns
Tratamentos	15	198,50	13,23	13,96	p < 0,05
Resíduo	48	45,50	0,94		
Total	63	224,00			

Anexo 2d- ANOVA massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	0,58	0,19	8,00	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	0,05	0,05	1,98	ns
Temperatura (F3)	1	15,51	15,51	635,68	p < 0,05
Int. F1xF2	3	0,17	0,05	2,27	ns
Int. F1xF3	3	0,43	0,14	5,92	p < 0,05
Int. F2xF3	1	0,38	0,38	15,80	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	0,29	0,10	4,04	p < 0,01
Tratamentos	15	17,42	1,16	47,61	p < 0,05
Resíduo	48	1,17	0,02		
Total	63	18,59			

Anexo 2e- ANOVA massa de matéria seca de raiz (MMSR)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	0,77	0,26	16,73	p < 0,05
[CO ₂] (F2)	1	0,05	0,05	3,42	ns
Temperatura (F3)	1	13,23	13,23	860,16	p < 0,05
Int. F1xF2	3	1,09	0,36	23,72	p < 0,05
Int. F1xF3	3	0,88	0,29	19,06	p < 0,05
Int. F2xF3	1	1,36	1,36	88,27	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	1,70	0,57	36,89	p < 0,01
Tratamentos	15	19,10	1,27	82,73	p < 0,05
Resíduo	48	0,74	0,01		
Total	63	19,84			

Anexo 2f- ANOVA relação parte aérea/raiz (PA/R)

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Significância
População (F1)	3	0,39	0,13	2,44	ns
[CO ₂] (F2)	1	0,34	0,34	6,49	p < 0,01
Temperatura (F3)	1	4,67	4,67	88,42	p < 0,05
Int. F1xF2	3	0,24	0,08	1,53	ns
Int. F1xF3	3	1,37	0,46	8,67	p < 0,05
Int. F2xF3	1	2,92	2,92	55,22	p < 0,05
Int. F1xF2xF3	3	1,34	0,44	8,46	p < 0,05
Tratamentos	15	11,28	0,75	14,23	p < 0,05
Resíduo	48	2,54	0,05		
Total	63	13,82			

8 VITA

Giliardi Dalazen é filho de Odi Oto Dalazen e Sebastiana de Barros Dalazen. Nasceu no dia 08 de fevereiro de 1986, em Erval Seco, RS. Completou o ensino médio e o curso de Técnico em Agropecuária em 2002, na Escola Estadual Técnica Celeste Gobbato, em Palmeira das Missões, RS. Em 2005, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS, graduando-se Eng^o Agrônomo em fevereiro de 2010. Durante o curso de Agronomia, atuou como aluno de iniciação científica, inicialmente na área de microbiologia do solo e, posteriormente, na área de defesa fitossanitária. Em 2010, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, com ênfase em herbologia, na Universidade Federal de Santa Maria, sendo bolsista CAPES. Concluiu o curso em fevereiro de 2012. No mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia, ênfase em herbologia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS, sendo bolsista CNPq durante o período.