

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

RESPOSTA DE *Echinochloa crus-galli* A FENOXAPROP-P-ETHYL FORMULADO  
COM PROTETOR E RESISTÊNCIA CRUZADA NEGATIVA A CLOMAZONE

Luan Cutti  
Engenheiro Agrônomo/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração: Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Cutti, Luan  
RESPOSTA DE *Echinochloa crus-galli* A  
FENOXAPROP-P-ETHYL FORMULADO COM PROTETOR E  
RESISTÊNCIA CRUZADA NEGATIVA A CLOMAZONE / Luan Cutti.  
-- 2018.  
159 f.  
Orientador: Aldo Merotto Junior.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2018.

1. Metabolização. 2. Enzimas P450. 3. Resistência  
múltipla. 4. Enzimas GST. 5. Safener. I. Merotto  
Junior, Aldo, orient. II. Título.

LUAN CUTTI  
Engenheiro Agrônomo - UFSM

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

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

Aprovado em: 27.02.2018  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 20.08.2019  
Por

ALDO MEROTTO JUNIOR  
Orientador - PPG Fitotecnia  
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

ITAMAR CRISTIANO NAVA  
PPG Fitotecnia/UFRGS

CATARINE MARKUS  
Departamento de Plantas de Lavoura  
UFRGS

ANDRÉ ANDRES  
EMBRAPA Clima Temperado  
Pelotas/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

**Dedico**

Aos meus pais Gilberto Cutti e Vandair Carmen Cutti,  
e irmã Daiane Cutti

*“Devi contare solo su di te  
Uno su mille ce la fa  
Ma quanto è dura la salita  
In gioco c'è la vita”*

(Franco Migliacci/Gianni Morandi)

*“Il mondo per essere mondo bisogna avere di tutto”*

(Domingos Cutti)

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, oportunidades e discernimento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Fitotecnia, pela oportunidade e estrutura oferecidas.

Ao Professor Aldo Merotto Junior pela orientação, amizade, paciência e ensinamentos.

Aos meus pais Gilberto Cutti e Vandair Carmen Cutti, minha irmã Daiane Cutti e cunhado Charles Moresco pelo incentivo, motivação, confiança, apoio emocional e financeiro. Obrigado pelo amor incondicional e pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar. Por acreditarem em mim e no meu sonho.

Ao amigo de infância Gustavo Bonometti por manter a amizade apesar da distância.

Aos amigos e colegas de pós-graduação do grupo de herbologia Alexandre, Andrew, Carlos Alberto, Catarine, Emerson, Mateus e Tiago pela amizade, auxílio nas atividades, compartilhamento diário de informações e ensinamentos.

Aos bolsistas de iniciação científica Alexssander, Christian, Emanuel, Guilherme, Mariah, Natane, Paula e Rafael pela amizade e auxílio nas atividades de pesquisa no decorrer destes dois anos.

Aos amigos Ana Luísa, Ana Paula, André, Carolina, Cátia, Cícero, Cristiano, Eduardo, Emílio, Gabriele, Geísa, Gerarda, Gustavo, Itacir, Jéssica, José Antônio, Laís, Leise, Leonardo, Liliana, Lucas, Luiz Gustavo, Luiza, Maike e Silmara. pelos momentos de convívio e descontração.

Aos servidores e técnicos administrativos do Departamento de Plantas de Lavoura e do PPG Fitotecnia pela prestatividade e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo durante o período de Mestrado.

Ao IRGA, em especial ao Dr. André da Rosa Ulguim, pela coleta de material para realização de parte deste trabalho.

# RESPOSTA DE *Echinochloa crus-galli* A FENOXAPROP-P-ETHYL FORMULADO COM PROTETOR E RESISTÊNCIA CRUZADA NEGATIVA A CLOMAZONE <sup>1</sup>

Autor: Luan Cutti

Orientador: Aldo Merotto Junior

## RESUMO

O capim-arroz é uma das principais espécies resistentes a herbicidas no mundo. No Brasil, existe grande ocorrência de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e quinclorac, sendo que atualmente herbicidas inibidores da enzima ACCase são alternativas para o controle de biótipos resistentes. No entanto, seu uso contínuo pode favorecer a evolução da resistência também para esse mecanismo de ação. O incremento de metabolização está associado a diversos biótipos de capim-arroz resistentes às imidazolinonas. Este mecanismo de resistência pode simultaneamente alterar processos de ativação de herbicidas. Biótipos resistentes podem ser manejados também com o herbicida clomazone, que necessita ser metabolizado na planta para ser ativo, e apresenta poucos casos de resistência no mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução da resistência a herbicidas inibidores da enzima ACCase e identificar a ocorrência de resistência cruzada negativa ao herbicida clomazone em populações resistentes a inibidores de ALS em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). Experimentos de curva de dose-resposta foram conduzidos em casa de vegetação. A resistência ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com protetor isoxadifen-ethyl (Starice®) e sem protetor (Podium®) foi testada sem e com aplicação de inibidores de enzimas P450 e GST previamente ao herbicida. Para o experimento de resistência múltipla foram testados os herbicidas quinclorac e imazethapyr em biótipo já caracterizado como resistente a fenoxaprop-p-ethyl. A resistência cruzada negativa (RCN) foi testada com aplicação de clomazone em quatro biótipos suscetíveis e quatro resistentes às imidazolinonas por metabolização. O biótipo 7.9 é resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, apresentando fator de resistência de aproximadamente seis. A aplicação de fenoxaprop-p-ethyl sem o protetor reverteu a resistência. A aplicação de inibidor de enzimas P450 não teve efeito negativo na resistência, enquanto que o uso de inibidor de enzimas GST foi eficiente em reduzir o fator de resistência de algumas variáveis. A resistência múltipla aos herbicidas quinclorac, imazethapyr e fenoxaprop-p-ethyl foi comprovada. Para o imazethapyr as enzimas GST apresentam papel na detoxificação. Verificou-se resistência cruzada negativa ao clomazone em biótipos resistentes às imidazolinonas por incremento de metabolização. O uso de inibidor de P450 reverteu a RCN. A ocorrência de RCN ao herbicida clomazone favorece a sua utilização no manejo da resistência em capim arroz. Foi comprovada a ocorrência de resistência a fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl em uma população de capim-arroz, o que acentua a necessidade de utilização de práticas de prevenção à evolução da resistência a herbicidas na cultura do arroz.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (159f.). Fevereiro, 2018.



# ***Echinochloa crus-galli* RESPONSE TO FENOXAPROP-P-ETHYL FORMULATED WITH SAFENER AND NEGATIVE CROSS-RESISTANCE TO CLOMAZONE<sup>1</sup>**

Author: Luan Cutti

Advisor: Aldo Merotto Junior

## **ABSTRACT**

Barnyardgrass is one of the major herbicide resistant weeds in the world. In Brazil, several biotypes are resistant to ALS inhibitors and quinclorac. Herbicides inhibitors of ACCase inhibitor are important alternatives for controlling these resistant biotypes. However, the continuous use of these herbicides suggests the evolution of the resistance also to this mechanism. In several populations the mechanism of resistance is related with degradation enhancement. This mechanism can simultaneously also result changes of herbicide activation. Barnyardgrass resistant biotypes can be controlled with the herbicide clomazone, which needs to be activated in the plant, and rare cases of resistance were found. The objectives of this work were to characterize the evolution of resistance to ACCase inhibitors and to identify the occurrence of negative cross-resistance (NCR) to clomazone in populations of *Echinochloa crus-galli* resistant to ALS inhibitors. Populations of barnyardgrass were evaluated and several dose-response experiments were conducted in greenhouse. Resistance was evaluated to the herbicide fenoxaprop-p-ethyl formulated with the safener isoxadifen-ethyl (Starice®) and without safener (Podium®), without and with application of inhibitors of P450 and GST enzymes prior the herbicide spraying. Multiple herbicide resistance was evaluated to quinclorac and imazethapyr in a biotype already characterized as resistant to fenoxaprop-p-ethyl. Negative cross-resistance was tested to clomazone in four susceptible and four imidazolinone-resistant biotypes caused by degradation enhancement. One biotype was resistant to the herbicide fenoxaprop-p-ethyl formulated with the safener isoxadifen-ethyl. The application of fenoxaprop-p-ethyl without the safener reversed the resistance. The application of inhibitor of P450 enzymes had no negative effect on resistance, however the use of GST enzyme inhibitor was efficient in reducing the resistance factor of some variables. Multiple resistance to herbicides quinclorac, imazethapyr and fenoxaprop-p-ethyl was identified. Inhibitors of GST enzymes play a role in detoxification. NCR to clomazone in imidazolinone-resistant biotypes was associate with P450 metabolism. This phenomenon favors the use of clomazone in herbicide resistant programs. Herbicide resistance to fenoxaprop-p-ethyl formulated with safener was identified in one barnyardgrass population which increase necessity of several methods do prevent the occurrence of resistance in this specie.

---

<sup>1</sup>Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (159p.). February, 2018.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo geral .....	3
1.2 Objetivos específicos .....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Resistência de plantas daninhas a herbicidas .....	5
2.2 Mecanismos de resistência a herbicidas.....	6
2.3 Resistência de capim-arroz a herbicidas .....	8
2.3.1 Resistência de capim-arroz a herbicidas inibidores da enzima ALS .....	10
2.3.2 Resistência de capim-arroz a herbicidas inibidores da enzima ACCase .....	12
2.3.3 Resistência ao quinclorac.....	16
2.4 Resistência cruzada negativa.....	19
2.5 Referências bibliográficas .....	22
3 CAPÍTULO 1 .....	32
3.1 Introdução.....	34
3.2 Material e métodos.....	36
3.2.1 Seleção das populações.....	36
3.2.1.1 Screening de populações com escape de controle a campo .....	36
3.2.1.2 Curva de dose-resposta preliminar ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl .....	37
3.2.2 Estudo da resistência e seu mecanismo na geração experimental G1 .....	38
3.2.3 Verificação da ocorrência de resistência cruzada .....	39
3.2.4 Curva de dose-resposta com fenoxaprop-p-ethyl formulado sem protetor .....	40
3.3 Resultados e discussão .....	40
3.3.1 Seleção dos biótipos .....	40
3.3.2 Estudo da resistência e seu mecanismo na geração experimental G1 .....	43
3.3.2.1 Ocorrência de incremento de metabolização via inibidor de P450.....	47
3.3.2.2 Ocorrência de incremento de metabolização via inibidor de GST .....	51
3.3.3 Verificação da ocorrência de resistência cruzada .....	54
3.3.4 Curva de dose-resposta com fenoxaprop-p-ethyl formulado sem protetor .....	55

	Página
3.4 Conclusão .....	61
3.5 Referências bibliográficas .....	62
4 CAPÍTULO 2 .....	66
4.1 Introdução.....	68
4.2 Material e métodos.....	70
4.2.1 Resistência ao quinclorac.....	71
4.2.2 Resistência ao imazethapyr .....	72
4.3 Resultados e discussão .....	72
4.3.1 Resistência ao herbicida quinclorac .....	72
4.3.2 Resistência ao herbicida imazethapyr .....	83
4.4 Conclusão .....	94
4.5 Referências bibliográficas .....	95
5 CAPÍTULO 3 .....	98
5.1 Introdução.....	100
5.2 Material e métodos.....	102
5.2.1 Aplicação do herbicida clomazone via foliar.....	102
5.2.2 Aplicação do herbicida clomazone via hidroponia .....	104
5.2.3 Aplicação do herbicida clomazone + inibidor de metabolização .....	105
5.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes .....	106
5.2.4.1 Extração das enzimas .....	106
5.2.4.2 Atividade da catalase (CAT) .....	107
5.2.4.3 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) .....	107
5.2.4.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD) .....	107
5.2.4.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	108
5.3 Resultados e discussão .....	108
5.3.1 Aplicação do herbicida clomazone via foliar e hidroponia .....	109
5.3.2 Aplicação do herbicida clomazone + inibidor de metabolização .....	124
5.3.3 Atividade de enzimas antioxidantes .....	131
5.4. Conclusão .....	135
5.5 Referências bibliográficas .....	136
6 CONCLUSÕES GERAIS .....	139
7 VITA.....	142

## LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1. Resistência de <i>Echinochloa crus-galli</i> ao fenoxaprop-p-ethyl associado ao protetor isoxadifen-ethyl	
1. Herbicidas inibidores da enzima ACCase aplicados no biótipo resistente a fenoxaprop-p-ethyl (Starice®) .....	39
2. Sobrevivência de uma população resistente (7.9) e duas suscetíveis (5.2 e 6.19) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, 21 DAT ...	42
3. Parâmetros da equação log-logística para a variável redução da massa seca da parte aérea de uma população resistente (7.9) e duas suscetíveis (5.2 e 6.19) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl.....	42
4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl.....	46
5. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de malathion (inibidor de enzimas P450) .....	50
6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de inibidor de enzimas GST .....	53
7. Controle visual 7, 14 e 21 DAT (%) e massa fresca (MFPA - g) e massa seca da parte aérea (MSPA - g) do biótipo de <i>Echinochloa crus-galli</i> , resistente ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com protetor, após aplicação de diversos herbicidas de dois grupos químicos com mecanismo inibidor da enzima ACCase .....	54
8. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl (Starice®), com aplicação da formulação de fenoxaprop-p-ethyl sem protetor (Podium®).....	58

CAPÍTULO 2. Resistência múltipla de *Echinochloa crus-galli* aos herbicidas imazethapyr e quinclorac em biótipo resistente ao fenoxaprop-p-ethyl

1. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) após aplicação do herbicida quinclorac, sem o uso de inibidores de metabolização. .... 74
2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) após aplicação do herbicida quinclorac, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. .... 77
3. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) após aplicação do herbicida quinclorac, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST. .... 80
4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01) após aplicação do herbicida imazethapyr, sem aplicação prévia de inibidor de metabolização..... 85
5. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01) após aplicação do herbicida imazethapyr, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450..... 88
6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01) após aplicação do herbicida imazethapyr, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST..... 91

CAPÍTULO 3. Resistência cruzada negativa ao clomazone em capim-arroz resistente às imidazolinonas causada por incremento de metabolização

1. Composição da solução nutritiva utilizada para o cultivo de capim-arroz em hidroponia..... 105
2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e quatro suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via aspersão foliar. .... 113
3. Fatores de resistência para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura e massa fresca e seca da parte aérea, através do cálculo  $FR = GR_{50} \text{ Resistente} / GR_{50} \text{ Suscetível}$ , comparando biótipos resistentes (ARRGR-01,

PALMS-02, BAGÉ-01 e RIOGR-01) e suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via aspersão foliar.....	115
4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7 e 14 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em dois biótipos resistentes (RIOGR-01 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via hidroponia.....	119
5. Fatores de resistência para as variáveis controle visual 7 e 14 DAT, índice de clorofila total, estatura e massa fresca e seca da parte aérea, através do cálculo $FR = GR_{50} \text{ Resistente} / GR_{50} \text{ Suscetível}$ , comparando dois biótipos resistentes (BAGÉ-01 e RIOGR-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via hidroponia.....	120
6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01) e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450, e tratados com clomazone via aspersão foliar. ....	128
7. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) com e sem aplicação do herbicida clomazone, 24 horas após a aplicação em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, RIOGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) às imidazolinonas.....	132
8. Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) com e sem aplicação do herbicida clomazone, 24 horas após a aplicação em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, RIOGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) às imidazolinonas.....	133
9. Quantificação de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$ ) com e sem aplicação do herbicida clomazone, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA), em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, RIOGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) às imidazolinonas.....	134

## LISTA DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO 1. Resistência de *Echinochloa crus-galli* ao fenoxaprop-p-ethyl associado ao protetor isoxadifen-ethyl

1. Sobrevivência do biótipo 7.9 ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, e morte de duas outras populações suscetíveis semeadas paralelamente na bandeja (A), e morte quase total de outras três populações ao herbicida cyhalofop-butyl (B). Screening realizado com dose de 34,5 e 90 g ha<sup>-1</sup> de fenoxaprop-p-ethyl e cyhalofop-butyl, respectivamente, que corresponde a 50% da dose recomendada. .... 41
2. Curva de dose-resposta preliminar ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, indicando o percentual de redução da massa seca da parte aérea em relação ao controle não tratado, de três biótipos de *Echinochloa crus-galli*, sendo dois suscetíveis (5.2 e 6.19) e um resistente (7.9). .... 43
3. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, sem aplicação prévia de inibidores de metabolização. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. .... 45
4. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B). .... 46
5. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de malathion (inibidor de enzimas P450). Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. .... 49
6. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B) com aplicação prévia de malathion (inibidor de enzimas P450). .... 50

7. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de NBD-Cl (inibidor de enzimas GST). Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. ..... 52
8. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de NBD-Cl (inibidor de enzimas GST). ..... 53
9. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de dois biótipos de *Echinochloa crus-galli*, um resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl + protetor (Starice®) após aplicação da formulação de fenoxaprop-p-ethyl sem protetor (Podium®). Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. ..... 57
10. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl (Podium®) nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B). ..... 58
- CAPÍTULO 2. Resistência múltipla de *Echinochloa crus-galli* aos herbicidas imazethapyr e quinclorac em biótipo resistente ao fenoxaprop-p-ethyl
1. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) após aplicação de quinclorac, sem aplicação prévia de inibidores de metabolização. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. ..... 73
2. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 37,5, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750 e 1125 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750, 1500, 3000 e 6000 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), sem aplicação prévia de inibidor de metabolização. .... 74
3. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) após aplicação de quinclorac, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. ..... 76
4. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 37,5, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750 e 1125



- g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750, 1500, 3000 e 6000 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. .... 77
5. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) após aplicação de quinclorac, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. .... 79
6. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 37,5, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750 e 1125 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750, 1500, 3000 e 6000 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST. .... 80
7. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (MOSTS-01) após aplicação de imazethapyr, sem aplicação prévia de inibidor de metabolização. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. .... 84
8. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 1,06, 5,3, 10,6, 15,9, 26,5, 53, 106 e 212 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 26,5, 53, 79,5, 106, 212, 424, 848 e 1696 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), sem aplicação prévia de inibidor de metabolização. .... 85
9. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (MOSTS-01) após aplicação de imazethapyr, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. .... 87
10. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 1,06, 5,3, 10,6, 15,9, 26,5, 53, 106 e 212 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 26,5, 53, 79,5, 106, 212, 424, 848 e 1696 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. .... 88
11. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (MOSTS-01) após aplicação de imazethapyr, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%. .... 90
12. Ilustração do crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 1,06, 5,3, 10,6, 15,9, 26,5, 53, 106 e 212 g.

ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 26,5, 53, 79,5, 106, 212, 424, 848 e 1696 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST..... 91

### CAPÍTULO 3. Resistência cruzada negativa ao clomazone em capim-arroz resistente às imidazolinonas causada por incremento de metabolização

1. Controle visual 14 DAT (A), controle visual 21 DAT (B), Índice de clorofila total (C), estatura de planta (D), massa fresca da parte aérea (E), massa seca da parte aérea (E) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e quatro suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, aspergidos com clomazone. .... 112
2. Biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, 21 DAT com o herbicida clomazone via aspersão foliar. .... 116
3. Controle visual 7 DAT (A), 14 DAT (B), Índice de clorofila total (C), estatura de planta (D), massa fresca da parte aérea (E), massa seca da parte aérea (E) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de dois biótipos resistentes (RIOGR-01 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) aos herbicidas imidazolinonas, tratados com clomazone via hidroponia. .... 118
4. Rota de metabolização do herbicida clomazone mediada por enzimas P450 em plantas sensíveis. (Adaptado de YASUOR *et al.*, 2010)..... 121
5. Relação entre o mecanismo de resistência ao imazethapyr e a ocorrência de resistência cruzada negativa ao clomazone em *Echinochloa crus-galli*. .... 125
6. Controle visual 14 DAT (A, B), controle visual 21 DAT (C, D) e Índice de clorofila total (E, F) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01 e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450 e tratados com clomazone via aspersão foliar..... 126
7. Estatura de planta (A, B), Massa fresca (C, D) e Massa seca da parte aérea (E, F) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01 e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450 e tratados com clomazone via aspersão foliar. .... 127
8. Biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01) e suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas 21 DAT com e sem inibidor de enzimas P450 e tratados com clomazone via aspersão foliar. .... 130

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz é o principal alimento básico para grande parte da população mundial. No Brasil, na safra 2016/17 foram cultivados mais de 1.456.000,00 ha de arroz irrigado, com produtividade média de 7.618,00 kg ha<sup>-1</sup> (Conab, 2017). Dentre as muitas causas de perdas em produtividade destaca-se a competição da cultura com as plantas daninhas, que tem a espécie capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) como uma das principais competidoras. Apenas uma planta m<sup>2</sup> pode reduzir a produtividade em até 11,3%, mostrando-se assim muito competitivo mesmo em baixas infestações (Galon *et al.*, 2007). Atualmente, o controle desta planta daninha ocorre principalmente com herbicidas dos mecanismos de ação inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS) e acetil coenzima-A carboxilase (ACCase), que são repetidamente utilizados em cultivos de arroz devido à eficiência e praticidade (Iwakami *et al.*, 2012).

O capim-arroz é listado como uma das mais importantes espécies resistentes aos herbicidas no mundo (Heap, 2017). No Brasil, os primeiros casos de resistência em *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* foram ao quinclorac, herbicida inibidor da síntese da parede celular, no ano de 1999 (Heap, 2017). Este cenário de resistência agravou-se recentemente com o uso de cultivares de arroz Clearfield®, resistentes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Esta tecnologia foi introduzida no Brasil em 2004 com o objetivo de controlar o arroz vermelho e outras plantas daninhas (Roso *et al.*, 2010). Porém, o uso continuado de cultivares CL sem rotação com herbicidas de outros mecanismos de ação, proporcionou a seleção de biótipos de *E. crus-galli* resistentes ao grupo das imidazolinonas

(Riar *et al.*, 2012) e resistência múltipla a inibidores da ALS + quinclorac (Matzenbacher *et al.*, 2014).

A resistência de capim-arroz aos herbicidas ALS ocorre por mecanismos relacionados e/ou não relacionados ao local de ação. Mutações nas sequências gênicas codificadoras da enzima ALS, como Trip574Leu e Ser653Asn, foram identificadas em *E. crus-galli* no Brasil (Matzenbacher *et al.*, 2014). De forma adicional, também foram identificados mecanismos não relacionados ao local de ação como responsáveis pela resistência desta espécie às imidazolinonas, devido a um incremento na taxa de metabolização do herbicida por ação de enzimas como citocromo P450 monooxigenase (P450) e glutathiona-S-transferase (GST) (Matzenbacher *et al.*, 2014; Dalazen, 2016).

Devido à evolução da resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da ALS e quinclorac, optou-se por herbicidas com mecanismos de ação alternativos para o controle desta espécie, como herbicidas inibidores da ACCase e clomazone. Herbicidas inibidores da ACCase são passíveis de serem utilizados em espécies cultivadas da família Poacea devido à presença de compostos protetores que garantem a seletividade para a cultura. No entanto, no Brasil esses herbicidas estão sendo utilizados de forma contínua e com frequente aumento de doses. Este cenário de utilização sugere a evolução da resistência de capim-arroz a este mecanismo de ação, de forma similar ao que já ocorre em diversos países (Huan *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2016). Desta forma, considera-se problemática a possibilidade de ocorrência de resistência também aos herbicidas inibidores da enzima ACCase, os quais representam uma importante ferramenta para o manejo de plantas daninhas no arroz. Além disso, a ocorrência de resistência múltipla quinclorac + ALS + ACCase limita ainda mais as ferramentas de controle químico do capim-arroz. O mecanismo de incremento na taxa de metabolização pode ser o responsável por conferir resistência aos herbicidas dos três mecanismos de ação, visto que já foi sugerido como responsável pela resistência tanto para quinclorac como para inibidores da ALS e ACCase (Dalazen, 2016; Matzenbacher *et al.*,

2014; Bakkali *et al.*, 2007). O conhecimento dos mecanismos de resistência a herbicidas é importante para preservar a utilidade destes no controle de plantas daninhas, e consequentemente, para a sustentabilidade da produção de arroz.

Determinados mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas podem conferir ainda aumento na sensibilidade a outros herbicidas, denominado de resistência cruzada negativa (Délye *et al.*, 2013). Esse efeito pode estar associado, por exemplo, ao incremento da taxa de metabolização do herbicida, um dos mecanismos de resistência identificado aos herbicidas inibidores da ALS. Plantas que apresentam resistência por metabolização, consequentemente podem aumentar a atividade de herbicidas como o clomazone, um pró-herbicida, que necessita ser metabolizado em 5-keto-clomazone para ser ativo nas plantas (Ferhatoglu & Barrett, 2006). A descoberta de biótipos com resistência cruzada negativa pode ser empregada como uma estratégia de gerenciamento da resistência de plantas daninhas, a fim de prevenir ou atrasar a evolução dessas populações (Gressel & Segel, 1990). Estes estudos são ainda mais importantes devido ao cenário desfavorável à perspectiva de lançamento de novos mecanismos de ação herbicida.

### **1.1 Objetivo geral**

Caracterizar a resistência aos herbicidas inibidores da enzima ACCase e identificar a ocorrência de resistência cruzada negativa ao herbicida clomazone em populações resistentes aos inibidores de ALS em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*).

### **1.2 Objetivos específicos**

i) Avaliar a ocorrência de *Echinochloa crus-galli* resistente aos herbicidas inibidores da enzima ACCase, e a resistência múltipla a outros herbicidas.

ii) Caracterizar o mecanismo de resistência de *Echinochloa crus-galli* aos herbicidas inibidores da enzima ACCase.

iii) Relacionar a resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS por incremento de metabolização com a ocorrência de maior suscetibilidade ao herbicida clomazone em biótipos de *Echinochloa crus-galli*;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Resistência de plantas daninhas a herbicidas

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é o resultado da evolução adaptativa das populações devido à intensa pressão de seleção exercida por estes compostos (Jasieniuk *et al.*, 1996; Neve *et al.*, 2009). Indivíduos menos sensíveis possuem vantagem seletiva em populações de plantas daninhas repetidamente tratadas com herbicidas de mesmo mecanismo de ação e, conseqüentemente, aumentam sua frequência na população (Délye *et al.*, 2013). A resistência aos herbicidas é caracterizada quando o biótipo sobrevive e consegue se reproduzir após ser submetido a uma dose de herbicida que seria letal em outros indivíduos da mesma espécie. Assim, plantas resistentes necessitam uma dose maior do herbicida para seu controle. As curvas dose-resposta permitem determinar o  $C_{50}$  (controle de 50%) e  $GR_{50}$  (redução de 50% da matéria seca) e, conseqüentemente, determinar o fator de resistência (FR) dos biótipos (Christoffoleti, 2002). A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um processo espontâneo no qual o herbicida age como agente selecionador de biótipos resistentes, que inicialmente estão em baixa frequência na área (Christoffoleti *et al.*, 1994). Pode ser originada pela seleção causada por um único herbicida ou pela seleção resultante do uso de diversos herbicidas que são utilizados sequencialmente ou simultaneamente (Preston *et al.*, 2009).

Dentre os biótipos resistentes, alguns deles apresentam resistência cruzada e/ou múltipla aos herbicidas, sendo o manejo desses biótipos mais limitante. A resistência cruzada é caracterizada quando um biótipo apresenta resistência a dois ou mais grupos químicos de

herbicidas de mesmo mecanismo de ação, e pode ser conferida a um biótipo por qualquer dos mecanismos que conferem resistência (Beckie & Tardif, 2012). A resistência múltipla ocorre em plantas que são resistentes a dois ou mais herbicidas de diferentes mecanismos de ação, caracterizando um problema complexo e de difícil solução (Patzoldt *et al.*, 2005).

No mundo são relatadas 486 espécies de plantas daninhas resistentes a um ou mais grupos de herbicidas (Heap, 2017). No Brasil existem 38 espécies de plantas daninhas resistentes e, dentre estas, sete são espécies comuns em lavouras de arroz (*Echinochloa crus-galli*, *Echinochloa crus-pavonis*, *Sagittaria montevidensis*, *Cyperus difformis*, *Cyperus iria*, *Fimbristylis miliacea* e *Oryza sativa*) (Heap, 2017).

## **2.2 Mecanismos de resistência a herbicidas**

Os mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas conhecidos até hoje são divididos em duas categorias: mecanismos relacionados ao local de ação (RLA) e não relacionados ao local de ação (NRLA) dos herbicidas (Powles & Yu, 2010). O mecanismo RLA é caracterizado por alterações estruturais em um único aminoácido na enzima alvo, que inibe ou reduz a sua afinidade de ligação com o herbicida, ou pela superexpressão da enzima alvo (Kaundun, 2010). Com relação aos herbicidas inibidores da enzima ALS foram identificadas alterações em oito códons que codificam a enzima ALS, que causam resistência a herbicidas com esse mecanismo de ação: Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653 e Gly654 (Beckie & Tardif, 2012; Heap, 2017; Panozzo *et al.*, 2017). Para herbicidas inibidores da enzima ACCase, as mutações observadas até o momento se distribuem em aminoácidos de sete posições do gene: Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Cys2088 e Gly2096 (Kaundun, 2010; Kaundun *et al.*, 2013a; Kaundun *et al.*, 2013b; Guo *et al.*, 2017). Mutações em diferentes posições do gene, ou diferentes mutações na mesma posição, geralmente conferem resistência cruzada à herbicidas (Beckie & Tardif, 2012).



A resistência RLA é também associada ao aumento da produção da enzima alvo do herbicida, que pode ser resultado do aumento do número de cópias do gene que codifica essa enzima. A superexpressão da enzima alvo é verificada principalmente na resistência ao herbicida glyphosate, como é o caso da espécie *Amaranthus palmeri*, que apresenta maior número de cópias do gene codificador da enzima EPSPS no biótipo resistente (Gaines *et al.*, 2010). No entanto, recentemente a superexpressão da enzima alvo foi relacionada também à resistência aos herbicidas inibidores da ACCase. A resistência de *Digitaria sanguinalis* a herbicidas do grupo químico dos ariloxifenoxipropionatos e das ciclohexadionas ocorre pela presença de 4,9 a 7,6 vezes mais cópias do gene ACCase e consequente, superexpressão no biótipo resistente (Laforest *et al.*, 2017).

Mecanismos de resistência NRLA correspondem à redução na quantidade de moléculas de herbicida que atingem o local de ação (Délye *et al.*, 2013). Estes mecanismos podem ocorrer devido ao aumento na capacidade de detoxificação de herbicidas (Dalazen, 2016; Matzenbacher *et al.*, 2014), redução da absorção (Koger & Reddy, 2005), translocação reduzida (Feng *et al.*, 2004) e sequestro no vacúolo (Ge *et al.*, 2010). A resistência NRLA pode apresentar herança genética do tipo monogênica ou poligênica (Délye, 2013), porém a poligênica é mais frequente (Yu & Powles, 2014). A evolução deste mecanismo pode ter ocorrido pelo acúmulo de genes com efeito aditivo por meio de reprodução sexual (Délye *et al.*, 2013a; Délye, 2013b; Petit *et al.*, 2010). Assim, ao contrário dos mecanismos RLA, mecanismos de resistência NRLA por vezes podem conferir resistência múltipla a grupos de herbicidas de diferentes mecanismos de ação (Powles & Yu, 2010; Yuan *et al.*, 2006).

Espécies com aumento da capacidade de detoxificação metabolizam o herbicida rapidamente em compostos não tóxicos, ou menos tóxicos, enquanto espécies suscetíveis são incapazes de fazê-lo, ou o fazem em taxa muito mais lenta (Powles & Yu, 2010). A detoxificação é conferida principalmente pela ação de enzimas não específicas como glutationa-S-transferase (Tal *et al.*, 1995) e citocromo P450 monooxigenase (P450) (Yun *et*

*al.*, 2005; Han *et al.*, 2013). As enzimas P450 fazem parte da fase I de metabolização, onde catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise. Normalmente agem através da hidroxilação ou desalquilação adicionando um átomo de oxigênio à molécula (Ghanizadeh & Harrington, 2017). O envolvimento de enzimas P450 na resistência de herbicidas tem sido principalmente identificado em gramíneas, o que pode ser explicado pelo maior número de genes *CYP*, em comparação às dicotiledôneas (Powles & Yu, 2010).

As enzimas glutathiona-S-transferase (GSTs) possuem função particular no mecanismo de proteção contra estresse oxidativo através da interação com espécie reativas de oxigênio (Dixon *et al.*, 1998). Além disso, GSTs são enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de vários substratos, provenientes da primeira fase de detoxificação, com glutathiona ou homoglutathiona (em leguminosas), formando assim produtos polares S-glutathiona (Yuan *et al.*, 2007). A conjugação de herbicidas mediada pelas GSTs é reportada como um mecanismo de resistência em plantas daninhas (Van Eerd *et al.*, 2003). Além disso, a conjugação está associada também à seletividade de culturas aos herbicidas. Culturas com maior expressão ou atividade destas enzimas, ou ainda herbicidas formulados com indutores de enzimas GSTs, permitem que alguns herbicidas sejam seletivos para os cultivos (Sun *et al.*, 2017; Buehring *et al.*, 2006;).

### **2.3 Resistência de capim-arroz a herbicidas**

O capim-arroz tem evoluído para resistência a diversos herbicidas. Atualmente são encontrados biótipos com resistência a quase todos os principais herbicidas utilizados na cultura do arroz (Heap, 2017). No Brasil os primeiros casos de resistência em *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* foram ao herbicida quinclorac, inibidor da síntese da parede celular em espécies da família Poaceae, no ano de 1999 (Heap, 2017). Em 2009, posterior à adoção da tecnologia Clearfield® nas lavouras orizícolas, foram identificados biótipos de *E. crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS + quinclorac (Heap, 2017;

Matzenbacher *et al.*, 2014). O uso de herbicidas inibidores da síntese da enzima ACCase, seletivos para a cultura do arroz, passaram então a ser fundamentais para o manejo desta planta daninha. No entanto, o seu uso contínuo também exerceu uma forte pressão de seleção. Recentemente um biótipo de *Echinochloa crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas inibidores ALS + quinclorac + inibidores da ACCase foi identificado no estado de Santa Catarina (Eberhardt *et al.*, 2016).

O gênero *Echinochloa* apresenta resistência a diversos outros herbicidas no mundo. O herbicida propanil, inibidor do fotossistema II, foi comercializado no início da década 1960 para o controle de capim-arroz, sendo intensamente utilizado nas lavouras até a década 1990 (Carey *et al.*, 1995b). O arroz possui tolerância a este herbicida pela presença de altas quantidades da enzima aryl acylamidase, que degrada cataliticamente o composto em produtos não-fitotóxicos, como 3,4-dicloroanilina e ácido propiônico (Frear & Still, 1968). Devido à grande pressão de seleção, o primeiro biótipo resistente foi identificado em 1990 (Carey *et al.*, 1995a). O mecanismo de resistência identificado até então refere-se ao mesmo mecanismo que confere seletividade ao arroz, isto é, uma maior taxa de metabolização mediada pela enzima aryl acylamidase (Carey *et al.*, 1997). Assim fica inviabilizado o uso de inibidor desta enzima, como carbaryl, associado ao herbicida, pelo fato de cultura e planta daninha apresentarem o mesmo mecanismo de resistência (Carey *et al.*, 1997). O uso do inibidor causaria morte tanto da planta daninha como da cultura.

Outro herbicida utilizado no manejo de plantas daninhas na cultura do arroz é o clomazone. Seu uso pode ser tanto em pré como em pós-emergência inicial. A resistência a este herbicida é pouco comum, no entanto foi identificada em *E. phyllopogon* (Yasuor *et al.*, 2010). A resistência nesses biótipos é atribuída à capacidade diferencial de detoxificação entre os biótipos resistentes e os suscetíveis. As plantas resistentes possuem maior atividade de hidroxilação, produzindo de 6 a 12 vezes mais o derivado mono-hidroxilado como

metabólito principal. Nas plantas suscetíveis, por sua vez, houve acúmulo de 2,5 vezes mais 5-keto-clomazone, que é o metabólito tóxico (Yasuor *et al.*, 2010).

Para o controle do capim-arroz resistente aos principais herbicidas seletivos para a cultura do arroz utiliza-se o glyphosate no pré-plantio da cultura ou no estágio de ponto-de-agulha. No entanto, houve seleção de biótipos de *E. colona* resistentes também a este herbicida (Alarcón-Reverte *et al.*, 2013; Gaines, *et al.*, 2012). O mecanismo refere-se à uma alteração no local de ação causado pelas mutações Pro106Ser, Pro106Thr e Pro106Leu (Alarcón-Reverte *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016).

A resistência a um determinado mecanismo de ação de herbicida torna o manejo desta planta daninha complexo nas lavouras. No entanto, são comuns casos de capim-arroz com resistência múltipla a herbicidas, o que resulta em um problema de maior proporção. No Arkansas, EUA, por exemplo, 28% dos biótipos coletados apresentaram resistência múltipla a herbicidas (Rouse *et al.*, 2017). No mundo, foram identificados biótipos de *E. crus-galli* com resistência múltipla a quinclorac + atrazina, sendo este último devido ao local de ação alterado (Lopez-Martinez *et al.*, 1997), inibidores da ACCase e inibidores da ALS (Iwakami *et al.*, 2015), propanil e quinclorac (Malik *et al.*, 2010), inibidores da ALS e quinclorac (Matzenbacher *et al.*, 2014), e inibidores ACCase, inibidores ALS, quinclorac e propanil (Heap, 2017). Ainda, foi identificada em *E. phyllopogon* resistência múltipla a thiobencarb, molinate, bispiribac-sodium e fenoxaprop-ethyl (Fischer *et al.*, 2000).

### 2.3.1 Resistência de capim-arroz a herbicidas inibidores da enzima ALS

A enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetohidroxiácido sintase (AHAS), é uma enzima chave envolvida na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada, como valina, leucina e isoleucina (Han *et al.*, 2012; Rizzardi *et al.*, 2004). Esta enzima catalisa duas reações paralelas associadas com a conversão de duas moléculas de piruvato em uma molécula de acetolactato e dióxido de carbono, e com a conversão de uma

molécula de piruvato e uma molécula de cetobutirato em uma molécula de acetohidroxitirato e dióxido de carbono (Han *et al.*, 2012). A inibição da atividade desta enzima irá afetar a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada e resultar na morte das plantas. A enzima ALS é a enzima-alvo de cinco grupos químicos de herbicidas: imidazolinonas, sulfoniluréias, triazolopirimidas, pirimidinilbenzoatos e sulfonilaminocarbonil-triazolinona. Os locais de ligação destes grupos químicos na enzima ALS estão próximos ao seu sítio catalítico e parcialmente sobrepostos (Yu & Powles, 2014).

Os herbicidas com mecanismo de ação inibidor da ALS possuem características que difundiram seu amplo uso desde a sua introdução no início de 1980. As principais propriedades são amplo espectro de ação, uso em baixas doses, seletividade em várias culturas, alta eficiência e baixa toxicidade para os mamíferos (Monquero & Christoffoleti, 2001). A utilização intensiva e ininterrupta de herbicidas com este mecanismo de ação pode rapidamente selecionar plantas daninhas resistentes (Han *et al.*, 2012). Esta seleção pode surgir após aproximadamente quatro anos de utilização sucessiva do agente de seleção, o que faz esta classe de herbicidas ser a de maior número de espécies resistentes no mundo (Powles & Yu, 2010). Entre as 250 espécies de plantas daninhas resistentes, 159 possuem resistência a herbicidas deste mecanismo de ação, o que evidencia a rápida evolução da resistência (Heap, 2017).

Inibidores da enzima ALS são comumente utilizados para controlar biótipos de *E. crus-galli* (Talbert & Burgos, 2007). A utilização de cultivares de arroz resistente às imidazolinonas (Clearfield®), iniciada em 2002 nos EUA e 2004 no Sul do Brasil, para controle do arroz vermelho, associada à grande utilização destes herbicidas, resultou no aumento do risco de ocorrência de populações de *E. crus-galli* resistentes aos inibidores da ALS (Santos *et al.*, 2007; Riar *et al.*, 2012). Diversas populações de *E. crus-galli* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS foram encontradas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (Matzenbacher, *et al.*, 2014; Merotto *et al.*, 2009; Mariot *et al.*, 2010).

Os mecanismos que conferem resistência de *E. crus-galli* aos herbicidas ALS, identificados até o momento, são mutação no gene codificador da enzima alvo e incremento na velocidade de detoxificação do herbicida. A presença da mutação Trp574Leu como mecanismo de resistência foi identificada em biótipos de capim-arroz no Norte da Grécia (Kaloumenos *et al.*, 2013), Itália (Panozzo *et al.*, 2013) e Brasil (Matzenbacher *et al.*, 2014). A ocorrência de resistência não relacionada ao local de ação, causada por incremento de detoxificação foi relatada em biótipos de *E. crus-galli* no Brasil (Matzenbacher *et al.*, 2014) e nos Estado Unidos da América (Riar *et al.*, 2012). Biótipo de *E. crus-galli* resistente ao herbicida imazethapyr apresentou maior expressão dos genes *CYP8IA6* e *GSTF1*, sendo a expressão 9,6 e 12,3 vezes superior, respectivamente, em comparação ao suscetível (Dalazen, 2016). Em *E. phyllopogon* a maior expressão dos genes *CYP8IA12* e *CYP8IA21* está associada à resistência aos herbicidas penoxsulam e bensulfuron-methyl (Iwakami *et al.*, 2014a), enquanto a maior expressão dos genes *CYP7IAK2* e *CYP72A254* está associada ao herbicida bispyribac-sodium (Iwakami *et al.*, 2014b).

A combinação dos dois mecanismos de resistência, RLA e NRLA, pode ocorrer em uma mesma planta. No Arkansas, EUA, estudos associaram as mutações Ala122Val e Ala122Thr à resistência aos inibidores da ALS em capim-arroz, e foi identificado também nos mesmos biótipos redução da translocação, provavelmente causada por incremento de metabolização (Riar *et al.*, 2013). No Brasil foi identificada a mutação Ser653Asn e aumento na taxa de metabolização como mecanismos de resistência em biótipo de *E. crus-galli* resistente às imidazolinonas (Matzenbacher *et al.*, 2014).

### 2.3.2 Resistência de capim-arroz a herbicidas inibidores da enzima ACCase

A enzima acetil coenzima-A carboxilase (ACCCase) catalisa a carboxilação da acetil-CoA para produzir malonil-CoA, precursor na via de biossíntese de ácidos graxos nas plantas (Délye, 2005). Quando este processo é inibido ocorre um prejuízo na síntese de lipídios,

verificando-se inibição do crescimento, uma vez que os lipídios são constituintes básicos das membranas, levando a planta à morte. Os herbicidas inibidores da ACCase são divididos em três grupos com base nas estruturas químicas: ariloxifenoxipropionatos (FOPs), ciclohexanedionas (DIMs) e fenilpiraxolina (DEN) (Délye, 2005; Hofer *et al.*, 2006; Muehlebach *et al.*, 2009).

As plantas possuem dois tipos de enzima ACCase, que estão localizadas no cloroplasto e no citosol (Konishi *et al.*, 1996; Zhi-Bo *et al.*, 2011). Plantas pertencentes à família Poaceae e Cyperaceae possuem a enzima ACCase do estroma do cloroplasto na mesma forma da enzima encontrada no citoplasma, a qual possui três domínios funcionais em um mesmo polipeptídeo: proteína carregadora de biotina carboxil (biotin carboxyl carrier protein - BCCP), biotina carboxilase (biotin carboxylase - BC) e carboxil transferase (carboxyl transferase - CT) (Nikolau *et al.*, 2003; Délye, 2005; Inledon & Hall, 1990). Entretanto, a enzima ACCase localizada no cloroplasto das demais espécies é heteromérica em relação à encontrada no citoplasma, com quatro subunidades (BCCP, BC, CT $\alpha$  e CT $\beta$ ) codificadas por diferentes genes. Os herbicidas com mecanismo de ação inibidor da ACCase atuam especificamente na enzima que possui três domínios, assim espécies com a enzima na forma heteromérica no cloroplasto são insensíveis aos herbicidas com este mecanismo de ação (Iwakami *et al.*, 2012; Konishi & Sasaki, 1994).

O uso de herbicidas inibidores da ACCase em lavouras de arroz é uma alternativa para o controle de plantas daninhas resistentes às imidazolinonas. Herbicidas ACCase são passíveis de serem utilizados em lavoura de arroz devido à presença de compostos protetores, também denominados antídotos ou “safeners”, que garantem a seletividade para a cultura (Lucini & Molinari, 2010). Porém, o uso contínuo de herbicidas com mecanismo de ação inibidor da ACCase propiciou a seleção de espécies de plantas daninhas resistentes também para este mecanismo de ação. Pesquisas apontam que a resistência de plantas daninhas gramíneas aos herbicidas inibidores da ACCase pode ser resultado de um

incremento na metabolização (Bakkali *et al.*, 2007), superprodução da enzima ACCase (Laforest *et al.*, 2017) ou por insensibilidade da enzima, devido à alteração do local de ação (Huan *et al.*, 2014). A resistência aos inibidores da ACCase por insensibilidade da enzima é consequência de alteração estrutural no seu domínio CT. Até o momento foram detectadas 14 alterações nos aminoácidos incorporados à enzima, distribuídos em 7 posições no domínio carboxil transferase (CT) da enzima (Powles & Yu, 2010; Beckie & Tardif, 2012; Kaundun *et al.*, 2013a; Kaundun *et al.*, 2013b; Kaundun, 2014).

A espécie *E. crus-galli* possui pelo menos três genes ativos codificadores da enzima ACCase, derivados da espécie *E. phyllopogon* (Iwakami *et al.*, 2012). Isto é explicado pelo genoma de *E. crus-galli* ser alohexaploide (6n), resultante de um cruzamento interespecífico entre *E. phyllopogon* (4n) e outra espécie diploide (2n) não identificada do gênero *Echinochloa* (Yabuno, 1966). O maior número de genes codificadores da ACCase em *E. crus-galli* indica redução da probabilidade de ocorrência de resistência por mutação na sequência codificadora da enzima, que consequentemente produziria um produto com alteração no local de ação do herbicida (Iwakami *et al.*, 2012).

Plantas com mais de duas cópias de genes codificantes da enzima alvo tendem a não adquirir a característica de resistência na presença de uma mutação em um gene, por um efeito de diluição (Iwakami *et al.*, 2012). O efeito de diluição refere-se ao produto gênico resistente ser menos expresso em comparação ao suscetível, por apresentar menor número de cópias, ou seja, as enzimas resistentes são diluídas em quantidades significativas de enzimas sensíveis, produzidas pelos genes com sequências codificadoras que não sofreram mutação (Iwakami *et al.*, 2012). Plantas que apresentarem apenas uma cópia do gene codificador da ACCase com mutação serão caracterizadas com resistência muito fraca. No entanto, deve-se notar que em aplicações de baixas doses de herbicidas a sobrevivência de uma planta com apenas um gene resistente seria maior do que uma planta de tipo silvestre, mesmo com o efeito de diluição. Em tais casos, até mesmo apenas um alelo resistente pode



conferir resistência suficiente para sobreviver à seleção com herbicida (Iwakami *et al.*, 2012). Assim, *E. crus-galli* é mais propensa a evoluir a mecanismos de resistência NLA em comparação à RLA para inibidores da ACCase (Iwakami, *et al.*, 2015). Contudo, se existirem populações de *E. crus-galli* com menor número de cópias de genes codificadores da ACCase, essas plantas daninhas podem exibir rapidamente resistência aos inibidores da ACCase por mecanismos RLA (Iwakami, *et al.*, 2015).

Herbicidas inibidores da ACCase são eficientes como estratégia alternativa do controle de capim-arroz resistente aos inibidores da ALS (Matzenbacher *et al.*, 2013). Porém, o uso contínuo destes herbicidas em lavouras de arroz favorece a evolução de populações resistentes. A resistência de capim-arroz aos herbicidas ACCase foi confirmada em diversos países. No Brasil foi verificada resistência múltipla de *E. crus-galli* ao herbicida cyhalofop, penoxsulam e quinclorac (Eberhardt *et al.*, 2016). O mecanismo de resistência não foi elucidado nesse estudo. Na China, biótipo de *E. crus-galli* apresentou resistência aos inibidores da ACCase por insensibilidade da enzima ao quizalofop-p-ethyl (Huan *et al.*, 2013). A resistência associada à super-expressão da enzima alvo foi descartada pois ambos biótipos, resistente e suscetível, apresentaram atividade basal da enzima ACCase similar.

Nos EUA a resistência de *E. phyllopogon* ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl foi relacionada ao incremento de metabolização, pelo fato do biótipo resistente apresentar uma taxa mais elevada de conjugação de GSH e de cisteína em comparação ao biótipo suscetível (Bakkali *et al.*, 2007). A resistência de *E. phyllopogon* ao cyhalofop-butyl, na Califórnia, foi associada a uma menor absorção do herbicida concomitantemente a um aumento na taxa de metabolização. Verificou-se que aproximadamente 50% do [<sup>14</sup>C]cyhalofop-butyl foi absorvido no biótipo suscetível, enquanto no resistente foi de 30%. Não foram observadas diferenças na translocação. Quanto ao metabolismo, os resultados mostraram que 24 horas após a aplicação 4,2% do cyhalofop-butyl total absorvido foi convertido em cyhalofop-ácido

e 76,71% em metabólitos polares no biótipo resistente, enquanto para o suscetível foi de 20,82% e 58,39%, respectivamente (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006).

Recentemente, um biótipo da espécie *E. colona*, encontrado no Mississipi, foi caracterizado como resistente a fenoxaprop-p-ethyl, no entanto s com mecanismo de resistência não identificado. O uso de inibidor de enzimas GST e P450 não reverteram a resistência. O ensaio enzimático caracterizou a enzima ACCase como sensível ao herbicida e não foram observadas mutações conhecidas no sequenciamento do gene codificador da ACCase (Wright *et al.*, 2016).

### 2.3.3 Resistência ao quinclorac

O quinclorac (3,7-dichloro-8-quinolinecarboxylic acid) foi inicialmente utilizado nos anos 90, com o objetivo de controlar capim-arroz resistente ao herbicida propanil, e outras gramíneas, nos Estados Unidos da América (Malik *et al.*, 2010). No Brasil, onde não há relatos de casos de resistência ao propanil, o quinclorac foi então utilizado como uma ferramenta alternativa a este herbicida por ser mais eficiente para o manejo de capim-arroz. O herbicida quinclorac induz a biossíntese de etileno através da via do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC). Este processo produz um co-produto tóxico, o cianeto, que é a principal ação do quinclorac. A produção de ACC induzida pelo quinclorac ocorre inicialmente nas raízes e, então o ACC acumulado é transportado da raiz para a parte aérea, onde promove a geração de etileno e cianeto. Devido a isso, o crescimento da parte aérea é mais suscetível aos danos causados pelo quinclorac em relação à raiz (Grossman, 1996; Grossman & Kwiatkowski, 1995). O estímulo da ACC sintase e consequente produção de cianeto (co-produto do etileno) atua como processo alvo responsável pela inibição do crescimento e morte celular em gramíneas sensíveis (Grossman, 1996). O etileno provoca ainda a curvatura descendente das folhas e estimula a biossíntese do ácido abscísico (ABA) através do aumento da quebra da xantofila em xantóxina, precursora de ABA, por 9-cis-

epoxycarotenoid dioxygenase no plastídio (Kraft *et al.*, 2007). Plantas tolerantes ao quinclorac, como o arroz, não respondem ao tratamento herbicida com aumento na síntese de etileno e cianeto (Grossman & Kwiatkowski, 2000).

No Brasil os primeiros casos de resistência de capim-arroz foram ao herbicida quinclorac no ano de 1999 (Heap, 2017). Na safra 2011/12 foram avaliadas 421 populações de capim-arroz coletadas no estado do RS, das quais 19% apresentaram resistência ao quinclorac e 14% com resistência múltipla a quinclorac e imidazolinonas (Matzenbacher *et al.*, 2014). No estado do Arkansas (EUA) 23% das 450 populações avaliadas entre 2006 e 2016 foram resistentes ao quinclorac, sendo o segundo problema mais comum de capim-arroz resistente (Rouse *et al.*, 2017).

Os mecanismos de resistência ao quinclorac ainda geram divergências na literatura. Atualmente o mecanismo de resistência mais aceito é a detoxificação do cianeto mediada pela enzima  $\beta$ -cianoalanina sintase ( $\beta$ -CAS) (Gao *et al.*, 2017; Yasuor *et al.*, 2012; Abdallah *et al.*, 2006). Esta enzima catalisa a conjugação de cianeto com cisteína para formar sulfeto de hidrogênio e  $\beta$ -cianoalanina, que por sua vez é metabolizado em asparagina (Yip & Yang, 1988). Biótipo de *E. crus-galli* suscetível apresentou uma menor atividade da enzima  $\beta$ -CAS em comparação com dois resistentes avaliados (Gao *et al.*, 2017). Um menor acúmulo de etileno e uma maior atividade da enzima  $\beta$ -CAS foram verificadas em *E. phyllopogon* resistente ao quinclorac, contudo a aplicação de malathion inibiu a atividade desta enzima e reverteu a resistência (Yasuor *et al.*, 2012). Populações resistentes com maior atividade de  $\beta$ -CAS podem evitar ou reduzir a toxidez por cianeto, induzido pela aplicação de quinclorac. Enquanto em biótipos suscetíveis o acúmulo de cianeto pode aumentar a atividade da ACC sintase, o que pode levar a mais produção de etileno e cianeto (Gao *et al.*, 2017). Os estudos verificaram ainda a ocorrência da mutação Met295Lys na sequência gênica codificadora da enzima  $\beta$ -CAS mais ativa de dois biótipos de *E. crus-galli* resistentes ao quinclorac, em comparação à sequência do biótipo suscetível. Esta substituição de aminoácidos é também

verificada na sequência gênica de arroz, ao qual o quinclorac apresenta seletividade, e pode estar associada à maior atividade da enzima (Gao *et al.*, 2017).

A diferença de absorção e translocação entre biótipos resistentes e suscetíveis ao quinclorac também foi estudada. Foi observada diferença de translocação, no entanto não é possível afirmar que seja responsável por conferir a resistência (Lovelace *et al.*, 2007). Outros trabalhos sugerem a detoxificação do quinclorac, através de enzimas comumente envolvidas na resistência aos herbicidas, como P450 e GSTs. O uso de inibidores de metabolização 1-aminobenzotriazole (ABT), piperonyl butoxide (PBO) e malathion reverteram a resistência de duas populações de *E. crus-galli* resistentes ao quinclorac (Matzenbacher *et al.*, 2014). Outro biótipo resistente apresentou maior expressão do gene *GSTF1* na presença e ausência do herbicida, sugerindo que enzimas GST podem contribuir parcialmente na resistência pela detoxificação direta, através da conjugação com glutathiona, ou indireta, eliminando espécies reativas de oxigênio (Li *et al.*, 2013). Todavia, o quinclorac provavelmente é resistente à metabolização em plantas, e a resistência em plantas daninhas e seletividade em culturas não são relacionadas à desintoxicação diferencial deste herbicida (Chism *et al.*, 1991; Grossman & Kwiatkowski, 2000).

A evolução da resistência aos herbicidas em capim-arroz torna esta espécie uma das mais importantes plantas daninhas do mundo (Heap, 2017). Mecanismos tanto relacionados como não-relacionados ao local de ação foram identificados como responsáveis pela resistência, além de múltiplos mecanismos em uma mesma planta (Matzenbacher *et al.*, 2014). Seu manejo deve ser gerenciado com rotação de herbicidas de diferentes mecanismos de ação. Quanto mais herbicidas de diferentes mecanismos de ação forem utilizados, as chances de selecionar biótipos resistentes são minimizadas, no entanto não eliminadas. A ocorrência de biótipos com resistência múltipla aos principais herbicidas utilizados na cultura do arroz pode ser manejada com a rotação de culturas na área, possibilitando aplicar herbicidas até então não utilizados.

## 2.4 Resistência cruzada negativa

Mecanismos de resistência envolvem alteração na sequência codificadora de proteínas essenciais para a planta, RLA, ou vias metabólicas secundárias, NRLA, similarmente aos mecanismos de defesa da planta (Pavlicev & Wagner, 2012; Purrington, 2000). Estes mecanismos, porém, podem estar associados a efeitos pleiotrópicos que conferem um custo adaptativo na ausência de pressão seletiva, como o aumento na sensibilidade a outros herbicidas (Délye et al, 2013b). No entanto, a resistência a herbicidas não está necessariamente associada a um custo adaptativo, pois esse depende do mecanismo de resistência, tipo de mutação verificada, genótipo, background da planta e condições ambientais (Bergeson & Purrington, 1996; Menchari *et al.*, 2008; Vila-Aiub *et al.*, 2009). A resistência cruzada negativa (RCN) trata-se de um fenômeno no qual o mecanismo que confere a resistência a um herbicida concomitantemente provoca maior suscetibilidade a outro (Gressel & Seguel, 1990a). A RCN pode ser resultado de mutações que afetam a sequência gênica codificadora da enzima, e estas, conseqüentemente, produzem um polipeptídeo com o local de ação do herbicida alterado (Taylor & Feyereisen, 1996), ou por efeitos de aumento na expressão de genes codificadores de enzimas detoxificadoras, ou mesmo incremento na atividade destas enzimas (Paul *et al.*, 2006; Raghavendra *et al.*, 2011).

Embora a resistência cruzada negativa seja pouco comum, a mesma foi descrita em algumas espécies de plantas daninhas, como *E. crus-galli* resistente às triazinas, que apresentou RCN a fluazifop-butyl, sethoxydim, metolachlor, chlorsulfuron e ammonium glufosinate (Gadamski *et al.*, 2000). No mesmo estudo foi verificada RCN em *Conyza canadensis* a MCPA, pyridate, fluroxypyr, glyphosate, diquat e bentazon. Esse efeito pode ser associado à penalidade conferida pela mutação no gene *psbA*, verificada em ambas espécies deste estudo, que confere resistência às triazinas e pode resultar em maior sensibilidade a estresses secundários, como outros herbicidas (Gadamski *et al.*, 2000). Entre

as penalidades conferidas pela mutação no gene *psbA* estão a diminuição da fotossíntese, menor produção de ATP e NADPH, levando à redução de 15 a 25% na fixação de CO<sub>2</sub> devido à taxa mais baixa de transferência de elétrons no fotossistema II (Ahrens and Stoller 1983; Holt *et al.* 1981).

Alterações no local de ação dos herbicidas através de substituição de aminoácidos podem conferir resistência a um herbicida, porém podem aumentar a afinidade a outro herbicida de mesmo mecanismo de ação. A mutação Val219Ile no gene *psbA* de *Cyperus difformis* ao mesmo tempo que causa resistência ao propanil, aumenta a suscetibilidade ao herbicida bentazon, ambos inibidores do FS II (Pedroso *et al.*, 2016). Assim também a mutação Ser264Gly, em *Amaranthus hybridus* causa resistência a atrazina, ametrina e bromacil e confere aumento na sensibilidade ao bentazon e diuron, e em *Amaranthus retroflexus* causa resistência à ametrina, atrazina, bromacil, diuron, linuron, metribuzin e metamitron, e aumenta a suscetibilidade ao bentazon e ioxynil (Oettmeier, 1999). Da mesma forma, em *Chenopodium album* esta mutação confere resistência à atrazina, ametrina, bromacil, diuron e metribuzin e maior suscetibilidade ao bentazon (Oettmeier, 1999). Neste mesmo sentido, *Amaranthus hybridus* resistente às imidazolinonas teve sua sensibilidade aumentada ao cloransulam-methyl, outro inibidor da enzima ALS, mas do grupo químico triazolopyrimidine (Poston *et al.*, 2001). A tolerância diferencial ao cloransulam-methyl em plantas suscetíveis e resistentes às imidazolinonas não foi explicada por diferenças de absorção, translocação e metabolismo do herbicida. Contudo, plantas resistentes apresentaram a enzima ALS 25 vezes mais sensível ao cloransulam-methyl em relação às suscetíveis.

Outros trabalhos verificaram a ocorrência de RCN, no entanto sem explicação clara do mecanismo. *Kochia scoparia* resistente a herbicidas inibidores da ALS devido à mutação Trp574Leu apresentou maior suscetibilidade ao mesotrione e pyrasulfotole, inibidores da

HPPD e ao carfentrazone, inibidor da enzima protox (Beckie *et al.*, 2012). No entanto, biótipos com a mutação Pro197Gln não apresentaram RCN. Este fenômeno, segundo os autores, é atribuído a um efeito pleiotrópico da mutação Trp574Leu, no entanto não há elucidação exata do mecanismo bioquímico ou fisiológico envolvido.

O fenômeno da RCN é verificado não apenas em plantas, mas também em insetos. A resistência aos inseticidas piretróides geralmente ocorre por incremento na capacidade de detoxificação do inseticida. Contudo, este mecanismo aumenta a suscetibilidade ao inseticida chlorfenapyr em *Heliothis virescens* (Pimprale *et al.*, 1997), *Musca domestica* (Scott *et al.*, 2004) e *Aedes aegypti* (Paul *et al.*, 2006). Isto ocorre pois o chlorfenapyr necessita de metabolização enzimática para ser ativado e ter efeito inseticida (Raghavendra *et al.*, 2011), similar ao que é verificado com o herbicida clomazone em plantas (Ferhatoglu & Barrett, 2006). Outros casos são verificados em insetos, como *Helicoverpa armigera* resistente à toxina Cry1AC é mais suscetível à abamectina (Xiao *et al.*, 2016), e *Spodoptera litura* resistente ao imidacloprid é mais suscetível ao inseticida methomyl (Abbas *et al.*, 2012).

A utilização de associação ou rotação de herbicidas com RCN pode ser capaz de retardar ou suprimir o surgimento de populações de plantas daninhas resistentes em áreas com alta pressão de seleção. Isso é possível pela capacidade de alguns herbicidas afetarem mais gravemente biótipos resistentes em relação aos biótipos suscetíveis a outro herbicida, ou seja, resistência cruzada negativa. A taxa de evolução de biótipos resistentes diminui quando é utilizado um herbicida com forte resistência cruzada negativa (Gressel & Segel, 1990b). A maioria dos autores que estudam o controle químico de plantas daninhas resistentes não testam os mesmos compostos nos biótipos sensíveis. Assim, muita informação potencialmente útil para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência é perdida (Gadamski *et al.*, 2000).

## 2.5 Referências bibliográficas

- ABBAS, N. *et al.* Fitness cost, cross resistance and realized heritability of resistance to imidacloprid in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 103, n. 3, p.181–188, 2012.
- ABDALLAH, I. *et al.* Mechanism of resistance to quinclorac in smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 84, n. 1, p.38-48, 2006.
- AHRENS, W.H.; STOLLER, E. W. Competition, growth rate and CO<sub>2</sub> fixation in triazine susceptible and resistant smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). **Weed Science**, Champaign, v. 31, n. 4, p.438–444, 1983.
- ALARCÓN-REVERTE, R. *et al.* Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, Champaign, v. 61, n. 1, p.48–54, 2013.
- BAKKALI, Y. *et al.* Late Watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): Mechanisms Involved in the Resistance to Fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 10, p.4052-4058, 2007.
- BECKIE, H.J.; TARDIF, F.J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, Guildford, v. 35, n. 1, p.15-28, 2012.
- BECKIE, H.J. *et al.* Negative Cross-Resistance of Acetolactate Synthase Inhibitor–Resistant Kochia (*Kochia scoparia*) to Protoporphyrinogen Oxidase– and Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase–Inhibiting Herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v. 26, n. 3, p.570-574, 2012.
- BERGELSON, J.; PURRINGTON, C.B. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. **The American Naturalist**, Chicago, v. 148, n. 3, p.536–558, 1996.
- BUEHRING, N. W. *et al.* Rice (*Oryza sativa*) Response and Annual Grass Control with Graminicides. **Weed Technology**, Champaign, v. 20, n. 3, p.738–744, 2006.
- CAREY, V. F. *et al.* Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass: absorption, translocation, site of action studies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 52, n. 3, p.182–189, 1995a.
- CAREY, V.F. *et al.* Verification and distribution of propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas. **Weed Technology**, Champaign, v. 9, n. 2, p.366–372, 1995b.
- CAREY, V. F. *et al.* Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass. II. In-vivo metabolism of the propanil molecule. **Journal of Pesticide Science**, Chichester, v. 49, n. 4, p.333–338, 1997.
- CHEN, G. *et al.* Penoxsulam-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in rice fields in China. **Weed Biology and Management**, Carlton, v. 16, n. 1, p.16–23, 2016.



CHISM, W.J. *et al.* Uptake, translocation, and metabolism of quinclorac in two grass species. **Weed Technology**, Champaign, v. 5, n. 4, p.771–775, 1991.

CHRISTOFFOLETI, P.J. *et al.* Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 12, n. 1, p.13-20, 1994.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p.513-519, 2002.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra 2016/2017: décimo levantamento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, Brasília, v. 4, n. 10, p. 1-170, set. 2017. Monitoramento agrícola. Projeto Observatório Agrícola.

DALAZEN, G. **Avaliação de genes relacionados ao incremento de metabolização e efeito da temperatura e da concentração de CO<sub>2</sub> em capim-arroz resistente a imazethapyr**. 2016. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

DÉLYE, C. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 5, p.728–746, 2005.

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

DÉLYE, C. *et al.* Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, London, v. 29, n. 11, p.649-658, 2013b.

DIXON, D. P. *et al.* Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 258-266, 1998.

EBERHARDT, D.S. *et al.* Barnyardgrass with multiple resistance to synthetic auxin, ALS and ACCase inhibitors. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 34, n. 4, p.823-832, 2016.

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

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 85, n. 1, p.7–14, 2006.

FISCHER, A.J. *et al.* Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. **Weed Science**, Champaign, v. 48, n. 2, p.225-230, 2000.

FREAR, D. S.; STILL, G. G. The metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. **Phytochemistry**, London, v. 7, p.913–920, 1968.

- GADAMSKI, G. *et al.* Negative Cross-Resistance in Triazine-Resistant Biotypes of *Echinochloa crus-galli* and *Conyza canadensis*. **Weed Science**, Champaign, v.48, n. 2, p.176-180, 2000.
- GAINES, T.A. *et al.* Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, Washington, v.107, n.3, p.1029–1034, 2010.
- GAINES, T.A.; CRIPPS, A.; POWLES, S. B. Evolved Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from the Tropical Ord River Region in Australia. **Weed Technology**, Champaign, v.26, n.3, p.480–484, 2012.
- GALON, L. *et al.* Estimativa das perdas de produtividade de grãos em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) pela interferência do capim-arroz (*Echinochloa* spp.). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 697-707, 2007.
- GAO, Y. *et al.* Resistance to quinclorac caused by the enhanced ability to detoxify cyanide and its molecular mechanism in *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.143, p.231-238, 2017.
- GE, X. *et al.* Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, Malden, v.66, n.4, p.345–348, 2010.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.C. Non-target Site Mechanisms of Resistance to Herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.36, n. 1, p.24-34, 2017.
- GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science**, Champaign, v. 5, p. 49-82, 1990.
- GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. Herbicide rotations and mixtures: effective strategies to delay resistance. In: GREEN, M.B.; LeBARON, H.L.; MOBERG, W.K. **Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990a. p. 430- 458.
- GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. Negative cross resistance; a possible key to atrazine resistance management: a call for whole plant data. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v.45, p.470–473, 1990b.
- GROSSMAN, K.; KWIATKOWSKI, J. Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.51, n.2, p.150–160, 1995.
- GROSSMAN, K. A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.97, n.4, p.772–775, 1996.
- GROSSMAN, K; KWIATKOWSKI, J. The mechanism of quinclorac selectivity in grasses. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.66, n.2, p.83–91, 2000.
- GUO, W. *et al.* A Rare Ile-2041-Thr Mutation in the ACCase Gene Confers Resistance to

ACCCase-inhibiting Herbicides in Shortawn Foxtail (*Alopecurus aequalis*). **Weed Science**, Champaign, v.65, n.2, p.239-246, 2017.

HAN, X. *et al.* Molecular basis of resistance to tribenuron-methyl in *Descurainia Sophia* (L.) populations from China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.104, n.1, p.77-81, 2012.

HAN, H. *et al.* Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-d in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. **Pest Management Science**, Malden, v.69, n.9, p.996–1000, 2013.

HAN, H. *et al.* Target-site EPSPS Pro-106 mutations: suficiente to endow glyphosate resistance in polyploid *Echinochloa colona*? **Pest Management Science**, Malden, v.72, n.2, p.264-271, 2016.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. [2017]. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

HOFER, U. *et al.* Pinoxaden – for broad spectrum grass weedmanagement in cereal crops. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.113, n.20, p.989–995, 2006.

HOLT, J. S. *et al.* Differential light responses of photosynthesis by triazine-resistant and triazine-susceptible *Senecio vulgaris* biotypes. **Plant Physiology**, Rockville, v.67, n.4, p.744–748, 1981.

HUAN, Z. *et al.* Determination of ACCase Sensitivity and Gene Expression in Quizalofop–Ethyl-Resistant and -Susceptible Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) Biotypes. **Weed Science**, Champaign, v.61, n.4, p.537-542, 2013.

INCLEDON, B.J.; HALL, C.J. Acetyl-coenzyme A carboxylase: quaternary structure and inhibition by graminicidal herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.57, n.3, p.255–271, 1990.

IWAKAMI, S. *et al.* Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. **Pest Management Science**, Malden, v.68, n.7, p.1098-1106, 2012.

IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, 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**, Malden, v.70, n.4, p. 549-558, 2014b.

IWAKAMI, S. *et al.* Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.119, p.1-8, 2015.

- JASIENIUK, M. *et al.* The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, Champaign, v.44, n.1, p.176–193, 1996.
- KALOUMENOS, N. S. *et al.* Target site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing). **Pest Management Science**, Malden, v.69, n.7, p.865–873, 2013.
- KAUNDUN, S.S. An aspartate to glycine change in the carboxyl transferase domain of acetyl-CoA carboxylase and non-target-site mechanism(s) confer resistance to ACCase inhibitor herbicides. **Pest Management Science**, Malden, v.66, n.11, p.1249–1256, 2010.
- KAUNDUN, S.S. *et al.* A novel W1999S mutation and non-target site resistance impact on acetyl-coA carboxylase inhibiting herbicides to varying degrees in a UK *Lolium multiflorum* population. **PLoS ONE**, San Francisco, v.8, n.2, e58012, 2013a.
- KAUNDUN, S.S. *et al.* Role of a novel I1781T mutation and other mechanisms in conferring resistance to acetyl-coA carboxylase inhibiting herbicides in a black-grass population. **PLoS ONE**, San Francisco, v.8, n.7, e69568, 2013b.
- KAUNDUN, S.S. Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, Malden, v.70, n.9, p.1405–1417, 2014.
- KOGER, K.; REDDY, C. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Champaign, v.53, n.1, p.84-89, 2005.
- KONISHI, T.; SASAKI, Y. Compartmentalization of two forms of acetylCoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. **Plant Biology**, New York, v.91, n.9, p.3598–3601, 1994.
- KONISHI, T. *et al.* Acetyl-coA carboxylase in higher plants most plants other than Gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v.37, n.2, p.117–122, 1996.
- KRAFT, M. *et al.* Indole-3-acetic acid and auxin herbicides up-regulate 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene expression and abscisic acid accumulation in cleavers (*Galium aparine*): interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, n.6, p.1497–1503, 2007.
- LAFORREST, M. *et al.* Acetyl-CoA carboxylase overexpression in herbicide-resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Pest Management Science**, Malden, v.73, n.11, p.2227-2235, 2017.
- 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.
- LOPEZ-MARTINEZ, N.; MARSHALL, G.; DE PRADO, R. Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to atrazine and quinclorac. **Pesticide Science**, Chichester, v.51, n.2, p.171–175, 1997.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F. **Resistência de populações da planta daninha *Digitaria ciliaries* (Retz.) Koel. a herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCCase).** 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Recomendações gerais para o manejo integrado de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas.** 3 ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.109-120.

LOVELACE, M.L. *et al.* Quinclorac Absorption and Translocation Characteristics in Quinclorac- and Propanil-Resistant and -Susceptible Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) Biotypes. **Weed Technology**, Champaign, v.21, n.3, p.683–687, 2007.

LUCINI, L.; MOLINARI, G.P. Residues of the herbicide fenoxaprop-P-ethyl, its agronomic safener isoxadifen-ethyl and their metabolites in rice after field application. **Pest Management Science**, Malden, v.66, n.6, p.621–626, 2010.

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

MARIOT, C. H. P.; MENEZES, V. G.; SOUZA, P. A. Resistência múltipla e cruzada de capim-arroz aos herbicidas na cultura de arroz no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais[...]** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 1455-1459.

MATZENBACHER, F.O., *et al.* Rapid diagnosis of resistance to imidazolinone herbicides in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and control of resistant biotypes with alternative herbicides. **Planta Daninha**, Viçosa, v.31, n.3, p.645-656, 2013.

MATZENBACHER *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, London, v.153, n. 6, p.1044-1058, 2014.

MECHANT, E.; BULCKE, R. Cross-resistance profile of metamilon-resistant *Chenopodium album* L. biotypes from sugar beet. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.71, p.147-153, 2006.

MENCHARI, Y.; CHAUVEL, B.; DARMENCY, H.; DÉLYE, C. Fitness cost associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.45, n.3, p.939–947, 2008.

MEROTTO, A. *et al.* Resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais[...]** Porto Alegre: Palotti, p. 312-315, 2009. p. 312-315.

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

- MUEHLEBACH, M. *et al.* Aryldiones incorporating a 1,4,5-oxadiazepane ring. Part I: Discovery of the novel cereal herbicide pinoxaden. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.17, n.12, p.4241–4256, 2009.
- NEVE, P. *et al.* Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist**, London, v.184, n.4, p.783–793, 2009.
- NIKOLAU, B.J.; OHLROGGE, J.B.; WURTELE, E.S. Plant biotin-containing carboxylases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.414, n.2, p.211–222, 2003.
- OETTMEIER, W. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.55, n.10, p.1255–1277, 1999.
- OSUNA, M.D. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.73, n.1, p.9–17, 2002.
- OWEN, M.K.E.; GRESSEL, J. Non-traditional concepts of Synergy for evaluating integrated weed management. In: HALL, J.C.; HOAGLAND, R.; ZABLOTOWICZ, R. (Eds). **Pesticide Biotransformations in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences**. Clarendon Hills, IL: American Chemical Society Publications, 2000.
- PANOZZO, S. *et al.* Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.105, n.2, p.93–101, 2013.
- PANOZZO, S. *et al.* A New Ala-122-Asn Amino Acid Change Confers Decreased Fitness to ALS-Resistant *Echinochloa crus-galli*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.8, n.2042, 2017.
- PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; HAGER, A.G. A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype with multiple resistance across three herbicide sites of action. **Weed Science**, Champaign, v.53, n.1, p.30–36, 2005.
- PAUL, A. *et al.* Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v.43, n.1, p.55–60, 2006.
- PEDROSO, R.M. *et al.* A psbA mutation (Val219 to Ile) causes resistance to propanil and increased susceptibility to bentazon in *Cyperus difformis*. **Pest Management Science**, Malden, v.72, n.9, p.1673–1680, 2016.
- PETIT, C.; DUHIEU, B.; BOUCANSAUD, K.; DÉLYE, C. Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds. **Plant Science**, Shannon, v.178, n.6, p.501–509, 2010.

- PIMPRALE, S.S. *et al.* Increased Susceptibility of Pyrethroid-Resistant Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Chlorfenapyr. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v.90, n.1, p.49-54, 1997.
- PAVLICEV, M.; WAGNER, G.P. A model of developmental evolution: selection, pleiotropy and compensation. **Trends Ecology Evolution**, Amsterdam, v.27, n.6, p.316-322, 2012.
- POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.317–347, 2010.
- PRADO, R.; SANCHEZ, M.; JORRIN, J.; DOMINGUEZ, C. Negative Cross-Resistance to Bentazone and Pyridate in Atrazine-Resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* Biotypes. **Journal of Pesticide Science**, Chichester, v.35, n.2, p.131-136, 1992.
- PRESTON, C. *et al.* A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. **Weed Science**, Champaign, v. 57, n.4, p. 435-441, 2009.
- PURRINGTON, C.B. Costs of resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, n.4, p.305–308, 2000.
- RAGHAVENDRA, K. *et al.* Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malária vectors. **Malaria Journal**, London, v.10, 16, 2011.
- RIAR, D.S. *et al.* Resistance of *Echinochloa crus-galli* Populations to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides. **International Journal of Agronomy**, 893953, 2012.
- RIAR, D. S. *et al.* Physiological and Molecular Basis of Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicide Resistance in Barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n.2, p. 278-289, 2013.
- RIZZARDI, M.A. *et al.* Aspectos gerais do controle de plantas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. (Ed.) **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 105-144.
- ROSO, A.C. *et al.* Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 119, n.1, p.175-182, 2010.
- ROUSE, C. E. *et al.* *Echinochloa* Resistance to Herbicides Continues to Increase in Arkansas Rice Fields. **Weed Technology**, Champaign, v.32, n.1, p.34-44, 2017.
- RUIZ-SANTAELLA, J.P. *et al.* Resistance mechanisms to cyhalofop-butyl in a biotype of *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. from California. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.20, p.95-100, 2006.
- SANTOS, F.M. *et al.* Red rice chemical control in irrigated rice. **Planta Daninha**, Viçosa, v.25, n.2, p.405-412, 2007.

- SCOTT, J.G. *et al.* Insecticide Resistant Strains of House Flies (*Musca domestica*) Show Limited Cross-Resistance to Chlorfenapyr. **Journal of Pesticide Science**, Chichester, v.29, n.2, p.124-126, 2004.
- STREIBIG, J.C. Joint action of root-absorbed mixtures of auxin herbicides in *Sinapis alba* L. and barley (*Hordeum vulgare* L.). **Weed Research**, Oxford, v.27, n.5, p.337–347, 1987.
- SUN, L. *et al.* Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. **PLoS ONE**, San Francisco, v.12, n.3, e0173502, 2017.
- TAL, J.A. *et al.* Non-enzymatic conjugation of fenoxaprop-ethyl with glutathione and cysteine in several grass species. **Weed Research**, Oxford, v.35, n.3, p.133–139, 1995.
- TALBERT, R.E.; BURGOS, N.R. History and management of herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas rice. **Weed Technology**, Champaign, v.21, n.2, p.324–331, 2007.
- TAYLOR, M.; FEYEREISEN, R. Molecular Biology and Evolution of Resistance to Toxicants. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v.13, n.6, p.719-734, 1996.
- VALVERDE, B. E. *et al.* Modified herbicide regimes for propanil-resistant junglerice control in rain-fed rice. **Weed Science**, Champaign, v. 49, n.3, p.395–405, 2001.
- VAN EERD, L.L. *et al.* Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, Champaign, v.51, n.4, p.472-495, 2003.
- VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness cost associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, London, v.184, n.4, p.751–767, 2009.
- WRIGTH, A.A. *et al.* Characterization of Fenoxaprop-P-Ethyl–Resistant Junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaign, v.64, n.4, p.588-595, 2016.
- XIAO, Y. *et al.* Resistance to *Bacillus thuringiensis* Mediated by an ABC Transporter Mutation Increases Susceptibility to Toxins from Other Bacteria in an Invasive Insect. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.12, n.2, e1005450, 2016.
- YABUNO, T. Biosystematic study of the genus *Echinochloa*. **Journal of Japanese Botany**, Tokyo, v.19, p.277–323, 1966.
- YASUOR, H. *et al.* Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, n. 9, p. 3653-3660, 2009.
- YASUOR, H. Differential oxidative metabolism and 5-ketoclofazone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clomazone. **Plant Physiology**, Rockville, v.153, n.1, p.319–326, 2010.



- YASUOR, H. *et al.* Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, Malden, v.68, n.1, p.108–115, 2012.
- YU, Q.; POWLES, S.B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, Malden, v.70, n.9, p.1340–1350, 2014.
- YUAN, J.S. *et al.* Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.12, n.1, p.6-13, 2006.
- YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART, C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.
- YUN, M.S. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.83, n.2, p.107–114, 2005.
- ZHI-BO, H. *et al.* Cloning and sequence analysis of plastid acetyl-CoA carboxylase cDNA from two *Echinochloa crus-galli* biotypes. **Journal of Pesticide Science**, Chichester, v.36, n.4, p.461–466, 2011.

### **3 CAPÍTULO 1**

**Resistência de *Echinochloa crus-galli* ao fenoxaprop-p-ethyl associado ao protetor  
isoxadifen-ethyl**

## RESISTÊNCIA DE *Echinochloa crus-galli* AO FENOXAPROP-P-ETHYL ASSOCIADO AO PROTETOR ISOXADIFEN-ETHYL

### RESUMO

A utilização de herbicidas inibidores da enzima ACCase na cultura do arroz está aumentando devido à grande ocorrência de resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS e quinclorac. Alguns herbicidas inibidores da ACCase são passíveis de serem utilizados em lavouras de arroz devido à presença de compostos protetores. O objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da enzima ACCase e avaliar o efeito de protetores com o mecanismo de resistência. O estudo foi realizado com 52 biótipos de capim-arroz resultantes de escape ao controle com herbicidas inibidores da ACCase. O biótipo 7.9 mostrou-se potencialmente resistente no estudo inicial de seleção na dose de 34,5 g.ha<sup>-1</sup> de fenoxaprop-p-ethyl. Este biótipo e uma suscetível foram utilizadas em estudos de curvas de dose-resposta ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado sem e com o protetor isoxadifen-ethyl. As doses utilizadas foram de 0 a 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente, e 0 a 138 g.ha<sup>-1</sup> para o suscetível. Para ambos biótipos foram aplicados tratamentos sem e com o inibidor de glutathiona-s-transferase (GST) chloro-nitrobenzofurazan e de enzimas citocromo P450 monooxigenase (P450) malathion. Também foi avaliada a ocorrência de resistência cruzada a outros herbicidas inibidores da enzima ACCase. O biótipo 7.9 mostrou-se resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl + isoxadifen-ethyl, com fator de resistência de aproximadamente 6. Não houve morte das plantas com a maior dose testada, correspondente a 16 vezes a recomendada. A aplicação prévia de malathion não foi eficiente em reverter a resistência. O uso de inibidor de enzimas GST reduziu o FR da variável massa seca da parte aérea. A aplicação de fenoxaprop-p-ethyl sem protetor na formulação foi eficiente em reverter a resistência a partir de 100% da dose recomendada. Os herbicidas haloxyfop-p-methyl, clodinafop-propargyl, cyhalofop-butyl, clethodim, sethoxydim, quizalofop-p-ethyl e fluazifop-p-butyl apresentam controle das plantas resistentes a fenoxaprop + isoxadifen-ethyl aos 21 DAT. A ocorrência de biótipo de *Echinochoa crus-galli* resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl foi confirmada, com participação de enzimas GST no incremento na capacidade de detoxificação. O uso do protetor isoxadifen-ethyl na formulação do herbicida fenoxaprop-p-ethyl está relacionado com a sobrevivência de plantas de *Echinochloa crus-galli*. A indução da resistência pela presença do protetor ocorreu em apenas no biótipo resistente e não teve efeito no suscetível, indicando que o biótipo possui um aparato enzimático de metabolização responsivo ao protetor que favorece a detoxificação do herbicida fenoxaprop. A utilização de protetores com o objetivo de aumentar a seletividade em culturas pode favorecer a ocorrência de resistência a herbicidas principalmente em espécies cuja resistência já ocorra devido a mecanismos de incremento de metabolização.

### 3.1 Introdução

A ocorrência da resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da ALS, por incremento de detoxificação, e ao quinclorac é amplamente distribuída nas lavouras de arroz (Matzenbacher *et al.*, 2014; Dalazen, 2016). A avaliação de 421 populações de capim-arroz coletadas no estado do Rio Grande do Sul mostrou que 60% dessas são resistentes a imazethapyr + imazapic, 19% resistentes ao quinclorac e 14% apresentam resistência múltipla aos inibidores da ALS + quinclorac (Matzenbacher *et al.*, 2014). A solução para o controle do capim-arroz em grande parte dessas lavouras é a utilização de herbicidas com outros mecanismos de ação, como herbicidas inibidores da enzima ACCase. No entanto, no Brasil esses herbicidas estão sendo utilizados de forma contínua e com frequente aumento nas doses. Este cenário de utilização de um mesmo herbicida indica a evolução da resistência, de forma similar ao que já ocorre em diversos países (Huan *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2016). Desta forma, considera-se problemática a possibilidade de ocorrência de resistência também aos herbicidas inibidores da enzima ACCase, pois são uma importante ferramenta para o manejo de plantas daninhas no arroz.

Herbicidas inibidores da ACCase são passíveis de serem utilizados em espécies cultivadas da família Poaceae devido à presença de compostos protetores, também denominados antídotos ou “safeners”, que garantem a seletividade para a cultura. O herbicida fenoxaprop-p-ethyl utilizado para controle de capim-arroz (Saini & Angiras, 2002) é formulado com o protetor isoxadifen-ethyl a fim de proteger a cultura de injúrias (Buehring *et al.*, 2006; Lucini & Molinari, 2011). A seletividade de fenoxaprop-p-ethyl para a cultura do trigo também é conferida com presença de protetores, como mefenpyr-diethyl (Belfry & Sikkema, 2015). Atualmente, os herbicidas utilizados em associação com um agente de proteção representam aproximadamente 30% do valor das vendas globais de herbicidas (Rosinger, 2014).

Os herbicidas devem cumprir dois critérios antagônicos para serem agrônomico e comercialmente bem-sucedidos. Primeiro permitir o controle eficiente de uma ampla gama de espécies de plantas daninhas, incluindo espécies taxonômicas próximas às culturas e segundo serem seletivos para as espécies vegetais cultivadas. O atendimento destes dois critérios foi responsável pelo sucesso dos protetores de herbicidas (Rosinger, 2014). Como os herbicidas, os protetores são compostos orgânicos bioativos, que quando aplicados em associação com herbicida têm a capacidade de diminuir a sensibilidade de uma ou várias espécies de culturas o suficiente para evitar danos dos herbicidas, sem reduzir a eficiência do controle de plantas daninhas no campo (Rosinger, 2014). Protetores diminuem a sensibilidade ao herbicida acelerando a sua metabolização em compostos menos ou não tóxicos (Duhoux *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação dos protetores ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, parecem atuar em rotas de metabolização, induzindo enzimas citocromo P450 monooxigenases (P450), glutathione-s-transferase (GST) e transportadores ABC com a finalidade de neutralizar o efeito herbicida nas culturas (Kraehmer *et al.*, 2014). Este mecanismo de detoxificação ocorre naturalmente em algumas plantas daninhas resistentes, principalmente em gramíneas, o que pode ser explicado pelo maior número de genes *CYP*, em comparação às dicotiledôneas (Powles & Yu, 2010). O incremento na capacidade de metabolização é um desafio pois pode culminar na resistência a herbicidas de diferentes mecanismos de ação. Recentemente é afirmado que o mecanismo de ação dos protetores é muito similar entre culturas e plantas daninhas (Duhoux *et al.*, 2017). Desta forma, a capacidade destes compostos protetores selecionarem também plantas daninhas merece especial atenção.

Estudos apontam que os herbicidas inibidores da enzima ACCase, como cyhalofop-butyl, ainda são eficientes no controle de capim-arroz no Brasil, principalmente em estágios iniciais (Kalsing *et al.*, 2017). Contudo, observa-se no campo um aumento frequente nas

doses necessárias para o controle desta espécie, o que sugere a evolução da resistência. Corroborando com isso, recentemente foi descrita a resistência de *Echinochloa crus-galli* ao herbicida cyhalofop-butyl no estado de Santa Catarina, Brasil, no entanto sem elucidação do mecanismo (Eberhardt *et al.*, 2016). O objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da enzima ACCase no Rio Grande do Sul, e elucidar o mecanismo de resistência.

### 3.2 Material e métodos

#### 3.2.1 Seleção das populações

##### 3.2.1.1 *Screening* de populações com escape de controle a campo

Na safra 2015/16 foram coletadas amostras de 52 biótipos de *E. crus-galli* que apresentaram escape de controle de herbicidas inibidores da enzima ACCase em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. Com as sementes coletadas realizou-se um *screening* em casa de vegetação climatizada, com temperatura média de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 14/10 horas (dia/noite), na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. As populações foram germinadas por imersão na solução de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$  0,2%) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por cinco dias e, posteriormente, foram transplantadas em bandejas preenchidas com solo. Cada bandeja abrigou três populações, semeadas em linhas. Quando as plantas atingiram 3-4 folhas aplicou-se o herbicida fenoxaprop-p-ethyl (Starice) ou cyhalofop-butyl (Clincher) na dose de 34,5 e 90  $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ , respectivamente, que correspondem a 50% da dose registrada em bula. A utilização da seleção com 50% da dose recomendada foi realizada para compensar as condições mais favoráveis de aplicação e de crescimento de plantas em casa de vegetação em comparação às condições existentes a campo. Adicionou-se adjuvante Aureo (0,5% v/v) e Veget'Oil (2  $\text{L}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) aos herbicidas

fenoxaprop-p-ethyl e cyhalofop-butyl, respectivamente. A aplicação foi realizada com câmara de aplicação automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), com ponta de pulverização TJ8002E e volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. As plantas foram mantidas em alagamento durante todo o período após o transplante, e foram crescidas até 21 dias após a aplicação (DAA). Ao final avaliou-se a ocorrência de plantas sobreviventes.

#### 3.2.1.2 Curva de dose-resposta preliminar ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl

A partir dos resultados do screening foi selecionada a população 7.9 como potencialmente resistente aos herbicidas inibidores da enzima ACCase. Foi realizado um estudo de curva de dose-resposta em arranjo fatorial 3x9, em delineamento completamente casualizado. O fator A consistiu de três populações de capim-arroz, sendo duas suscetíveis, coletadas no município de Rio Pardo (5.2) e Santa Maria (6.19), e uma potencialmente resistente ao fenoxaprop-p-ethyl, coletada no município de Santo Antônio da Patrulha (7.9). O fator B correspondeu a nove doses do herbicida fenoxaprop-p-ethyl (Starice®) (0; 17,25; 34,5; 51,75; 69,0; 138,0; 207,0; 276,0 e 552,0 g.ha<sup>-1</sup>). Cada tratamento foi composto por 14 repetições. Foi adicionado óleo vegetal Aureo (0,5% v/v) à calda de pulverização.

As condições de aplicação e condução do experimento seguiram conforme descrito anteriormente. Neste experimento as plantas foram transplantadas em vasos plásticos, com volume de 200 mL. Cada vaso foi perfurado e preenchido com uma mistura de solo + composto orgânico e complementação de adubação com NPK. Aos 21 DAT foram realizadas contagem de plantas sobreviventes a coleta da parte aérea das plantas para posterior secagem em estufa de circulação de ar forçada, 60 °C por sete dias, a fim de determinar a massa seca da parte aérea (MSPA). Três plantas sobreviventes foram mantidas para produção da geração experimental G1 e realização dos experimentos posteriores. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram ajustados pelo modelo de regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y = a / (1 + (x/x_0)^b)$ . Para o

biótipo resistente, foram consideradas apenas as plantas sobreviventes para o ajuste da regressão. Para a determinação dos valores de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$ , o  $y$  da equação foi substituído por 50 (50% de controle).  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  representam a dose necessária para atingir 50% de controle e 50% de redução de crescimento, respectivamente.

### 3.2.2 Estudo da resistência e seu mecanismo na geração experimental G1

A partir das sementes coletadas de plantas sobreviventes à aplicação do herbicida fenoxaprop-p-ethyl (Starice®) no estudo anterior, foram realizadas novas curvas de dose-resposta em casa de vegetação climatizada, no período de novembro/dezembro de 2017. O herbicida Starice® apresenta o protetor isoxadifen-ethyl na sua formulação comercial, um indutor de enzimas GST. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial  $2 \times 9 \times 3$ , em delineamento completamente casualizado. O fator A foi composto por duas populações, sendo uma resistente (7.9) e uma suscetível (5.2). O fator B por doses do herbicida, sendo as seguintes doses para a população resistente: 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69,0; 138,0; 276,0; 552,0 e 1104,0  $g \cdot ha^{-1}$ , que correspondem a 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 800 e 1600% da dose recomendada; e para a população suscetível: 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69,0 e 138,0  $g \cdot ha^{-1}$ , que correspondem a 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100 e 200% da dose recomendada. O Fator C consistiu da presença de inibidor de enzimas P450 (malathion), inibidor de enzimas GST (NBD-Cl) ou sem inibidor. Foi adicionado óleo vegetal (Aureo 0,5% v/v) à calda de pulverização com o herbicida Starice®. Cada tratamento foi composto por seis repetições.

A germinação, transplante, condução das plantas e aplicação dos herbicidas foram realizadas conforme descrito anteriormente. A aplicação do inibidor de metabolização via enzimas GST, 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), ocorreu 48 horas antes da aplicação do herbicida, na dose de 270  $g \cdot ha^{-1}$ , diluído em acetona, volume de calda 200  $L \cdot ha^{-1}$  (Wright *et al.*, 2016), enquanto a aplicação do malathion, inibidor de enzimas P450, antecedeu em



duas horas a aplicação dos herbicidas, na dose de 1000 g ha<sup>-1</sup>, volume de calda 200 L.ha<sup>-1</sup> (Matzenbacher *et al.*, 2014).

A avaliação de controle foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se uma escala percentual visual, na qual 0% corresponde ausência de injúrias, e 100% significa morte da planta. Aos 21 DAT foi realizada a avaliação de massa fresca da parte aérea (MFPA). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada, 60 °C por sete dias, e após foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram ajustados pelo modelo de regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y = a / (1 + (x/x_0)^b)$ . Os dados de controle visual foram transformados ( $\sqrt{x+1}$ ) para atenderem os requisitos da ANOVA. Para a determinação dos valores de C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub>, o y da equação foi substituído por 50 (50% de controle).

### 3.2.3 Verificação da ocorrência de resistência cruzada

Realizou-se aplicação de oito herbicidas inibidores da enzima ACCase na população resistente ao fenoxaprop-p-ethyl (7.9). A germinação, transplante, condução das plantas e aplicação foram realizadas de acordo com o descrito anteriormente. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Herbicidas inibidores da enzima ACCase aplicados no biótipo resistente ao fenoxaprop-p-ethyl (Starice®)

Nome comum	Nome comercial	Grupo químico*	Dose (g.ha <sup>-1</sup> )	Adjuvante
Fenoxaprop-p-ethyl	Starice	FOP	69	Aureo (0,5% v/v)
Haloxifop-p-methyl	Verdict	FOP	37,41	Assist (0,5% v/v)
Clodinafop-propargyl	Topik 240 EC	FOP	24	Assist (0,5% v/v)
Cyhalofop-butyl	Clincher	FOP	180	Veget'Oil (2 L.ha <sup>-1</sup> )
Clethodim	Select 240 EC	DIM	72	Dash (0,5% v/v)
Sethoxydim	Poast	DIM	184	Assist (0,5% v/v)
Quizalofop-p-ethyl	Targa Max	FOP	50	-
Fluazifop-p-butyl	Fusilade 250 EW	FOP	187,5	-

\*FOP's: Aryloxyphenoxy-propionate; DIM's: Cyclohexanedione

A avaliação de controle também foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se uma escala percentual visual, na qual 0% corresponde ausência de injúrias, e 100% significa morte da planta. Aos 21 DAT foi realizada a avaliação de massa fresca da parte aérea (MFPA). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada, 60°C por sete dias, e após foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram comparados pelo teste de Tukey 5%. Os dados de controle visual foram transformados ( $\sqrt{x+1}$ ) para atenderem aos requisitos da ANOVA.

#### 3.2.4 Curva de dose-resposta com fenoxaprop-p-ethyl formulado sem protetor

Foram realizadas curvas de dose-resposta com o herbicida Podium® (i.a. fenoxaprop-p-ethyl) que não possui protetor na formulação. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2x9, em delineamento completamente casualizado. O fator A consistiu de duas populações, sendo uma resistente (7.9) e uma suscetível (5.2). O fator B de doses do herbicida, sendo as seguintes doses para a população resistente: 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69,0; 138,0; 276,0; 552,0 e 1104,0 g.ha<sup>-1</sup>, que correspondem a 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 800 e 1600% da dose recomendada, e para a população suscetível: 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69,0 e 138,0 g.ha<sup>-1</sup>, que correspondem a 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100 e 200% da dose recomendada. Cada tratamento foi composto por seis repetições. A condução experimental, avaliações e análise estatística foram as mesmas descritas anteriormente.

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Seleção dos biótipos

Entre os 52 biótipos coletados em lavouras dispersas pelo estado do Rio Grande do Sul, apenas o denominado 7.9 mostrou-se potencialmente resistente aos herbicidas

inibidores da enzima ACCase, apresentando alto percentual de plantas sobreviventes com 50% da dose recomendada do herbicida fenoxaprop-p-ethyl (Figura 1). Dos biótipos testados, nenhum apresentou sobrevivência ao herbicida cyhalofop-butyl quando aplicada 50% da dose. Isto demonstra que muitos casos de escape de plantas ao controle químico não correspondem necessariamente à resistência, mas sim falhas na tecnologia de aplicação.

A partir dos resultados obtidos do *screening* inicial, realizou-se uma curva de dose-resposta ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, considerando-se a massa seca da parte aérea, aos 21 DAT, apenas das plantas sobreviventes para o ajuste da regressão log-logística (Figura 2; Tabela 2). A curva de dose-resposta da população 7.9 indica que a resistência estava em processo de segregação, devido ao percentual de sobrevivência após aplicação do herbicida fenoxaprop-p-ethyl (Tabela 2). Considerou-se como sobreviventes plantas com injúrias inferiores a 80%. Em todas as doses aplicadas, a sobrevivência foi inferior ou igual a 50%. Como controle, aplicou-se as mesmas doses em duas populações suscetíveis, 5.2 e 6.19, não houve plantas sobreviventes em doses superiores a  $17,25 \text{ g ha}^{-1}$ , que corresponde a 25% da dose recomendada em bula.

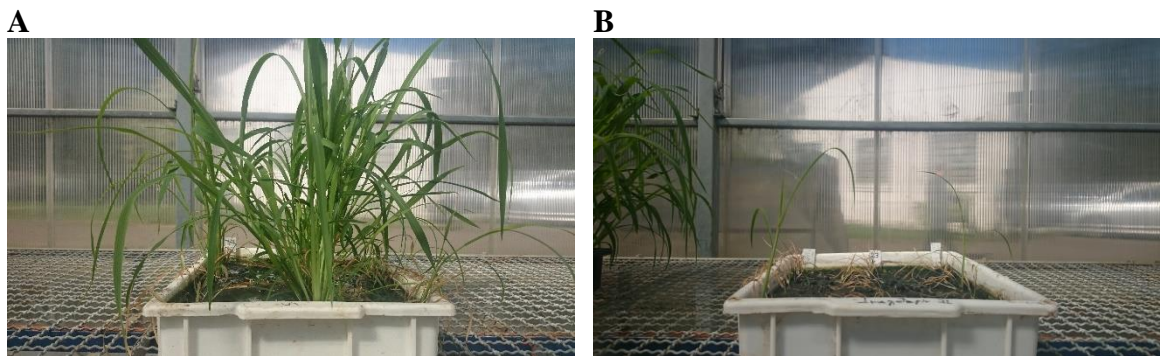


FIGURA 1. Sobrevivência do biótipo 7.9 ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, e morte de duas outras populações suscetíveis semeadas paralelamente na bandeja (A), e alta mortalidade de outras três populações ao herbicida cyhalofop-butyl (B). Screening realizado com dose de  $34,5$  e  $90 \text{ g ha}^{-1}$  de fenoxaprop-p-ethyl e cyhalofop-butyl, respectivamente, que corresponde a 50% da dose recomendada.

O biótipo 7.9 mostrou-se resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, apresentando uma dose de GR<sub>50</sub> de 205,535 g.ha<sup>-1</sup>, enquanto os dois biótipos suscetíveis 5.2 e 6.19 reduziram 50% de seu crescimento com doses de 6,105 e 4,142 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 3). Estes valores não são adequados para fins de comparações mais precisas, devido à alta segregação da população resistente. Assim, a curva preliminar de dose-resposta foi utilizada apenas para indicação inicial da resistência.

TABELA 2. Sobrevivência (%) de um biótipo resistente (7.9) e dois suscetíveis (5.2 e 6.19), coletados no campo, ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, 21 DAT

Biótipos	Doses de fenoxaprop-p-ethyl (g.ha <sup>-1</sup> )								
	0	17,25	34,5	51,75	69	138	207	276	552
	-----Sobrevivência (fitointoxicação <80%)-----								
5.2 (S)	100,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6.19 (S)	100,00	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7.9 (R)	100,00	50,00	41,67	41,67	33,33	8,33	33,33	25,00	16,67

TABELA 3. Parâmetros da equação log-logística para a variável redução da massa seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e dois suscetíveis (5.2 e 6.19) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl

Biótipos	Parâmetros da equação log-logística				
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X0</i>	GR <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>
	----- Massa Seca da Parte Aérea -----				
5.2 (S)	100,148*	-2,171*	6,113*	6,105	0,99
6.19 (S)	99,410*	-2,585*	4,123*	4,142	0,99
7.9 (R)	1049,020 <sup>ns</sup>	-0,3872 <sup>ns</sup>	469769,931 <sup>ns</sup>	205,535	0,88

\*parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup>parâmetros não significativos. GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir em 50% o crescimento.

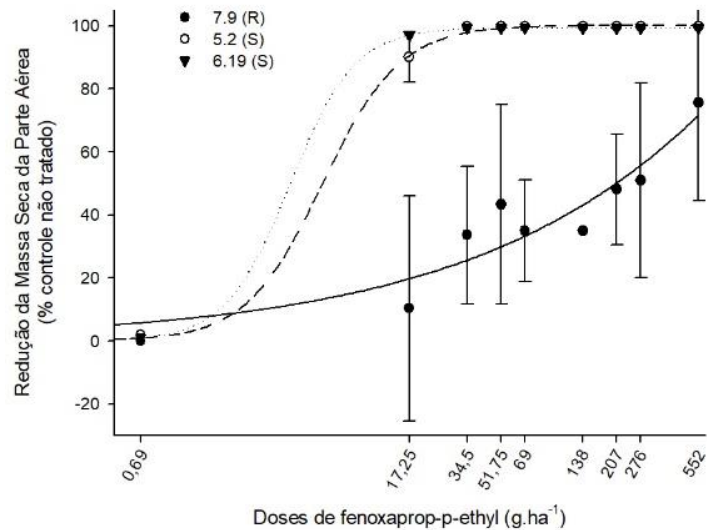


FIGURA 2. Curva de dose-resposta preliminar ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, indicando o percentual de redução da massa seca da parte aérea em relação ao controle não tratado, de três biótipos de *Echinochloa crus-galli*, sendo dois suscetíveis (5.2 e 6.19) e um resistente (7.9). Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 5%.

### 3.3.2 Estudo da resistência e seu mecanismo na geração experimental G1

Verificou-se interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os fatores avaliados em todas as variáveis analisadas. Quando aplicado o herbicida fenoxaprop-p-ethyl que contém em sua formulação o protetor isoxadifen-ethyl (Starice®), verificou-se que as plantas do biótipo 7.9 são resistentes. O percentual de intoxicação das plantas resistentes foi diminuindo no decorrer das avaliações visuais. Aos 21 DAT as plantas resistentes apresentaram intoxicação visual pouco expressiva, inferiores a 40% (Figura 3, Figura 4). Houve plantas sobreviventes até a dose máxima testada, correspondente à 16 vezes a recomendada. Para o biótipo suscetível (5.2) verificou-se plantas mortas já aos 7 DAT nas doses de 34,5, 69,0 e 138 g.ha<sup>-1</sup> de fenoxaprop-p-ethyl, que correspondem a 50, 100 e 200% a dose de campo recomendada em bula (Figura 3). A redução da estatura corroborou com o controle visual aos 14 e 21 DAT, nos quais não atingiu-se 50% com as doses aplicadas.

Os dados de MFPA indicam que o GR<sub>50</sub> do biótipo 7.9 foi de 76,620 g.ha<sup>-1</sup> de fenoxaprop-p-ethyl, enquanto para o suscetível foi 12,148 g.ha<sup>-1</sup>, resultando em um fator de resistência (FR) de 6,31 (Tabela 4). Para a variável MSPA os valores de GR<sub>50</sub> foram similares, resultando em um FR de 5,80. Pode-se observar que os dados de controle visual apresentaram as plantas resistentes menos intoxicadas em relação aos dados de massa fresca e seca.

A resistência de espécies do gênero *Echinochloa* aos herbicidas inibidores da enzima ACCase já é encontrada em diversos países. No Brasil o primeiro caso foi relatado em *E. crus-galli* no ano de 2016, sendo o biótipo resistente ao herbicida cyhalofop-butyl e também aos herbicidas penoxsulam e quinclorac, no entanto sem elucidação do mecanismo de resistência (Eberhardt *et al.*, 2016). Até o momento, apenas a resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da enzima ALS e quinclorac era amplamente distribuída nas lavouras de arroz (Matzenbacher *et al.*, 2014).

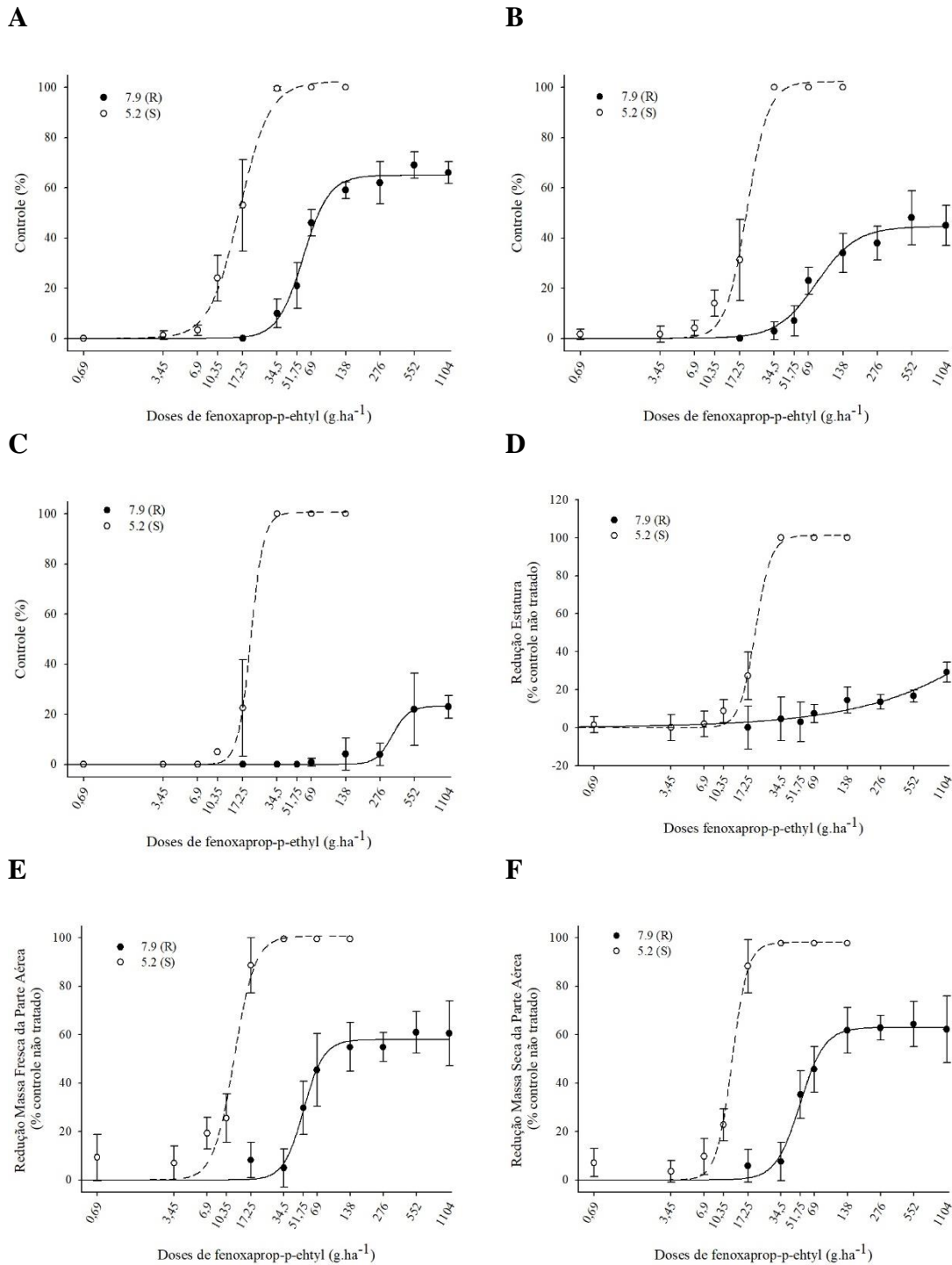


FIGURA 3. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, sem aplicação prévia de inibidores de metabolização. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução de estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl

Biótipos	Parâmetros			C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>			R <sup>2</sup>
	a	b	X0		Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
5.2 (S)	102,1962*	-3,2707*	16,126*	15,91	(16,28	15,47)	-	0,99
7.9 (R)	64,9201*	-3,8647*	58,508*	80,00	(86,58	74,85)	5,03*	0,99
----- Controle 14 DAT -----								
5.2 (S)	102,2068*	-4,6453*	19,908*	19,72	(20,43	18,83)	-	0,99
7.9 (R)	44,5240*	-2,5057*	81,200*	> 1104			>55,97*	0,97
----- Controle 21 DAT -----								
5.2 (S)	100,5529*	-7,6341*	20,264*	20,23	(20,99	19,43)	-	0,99
7.9 (R)	23,2200*	-6,0954*	353,966*	> 1104			>54,56*	0,97
----- Estatura -----								
5.2 (S)	101,2019*	-6,029*	20,162*	20,08	(20,79	19,28)	-	0,99
7.9 (R)	199,1660 <sup>ns</sup>	-0,5764 <sup>ns</sup>	25260,348 <sup>ns</sup>	>1104			>54,97*	0,91
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	100,6502*	-4,5978*	12,182*	12,14	(12,67	11,48)	-	0,97
7.9 (R)	57,8920*	-4,7768*	52,059*	76,62	(85,08	71,16)	6,31*	0,97
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	98,1065*	-6,1176*	12,379*	12,45	(12,83	12,04)	-	0,99
7.9 (R)	62,9764*	-3,9387*	51,344*	72,31	(77,30	68,27)	5,80*	0,99

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50%; GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%. EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

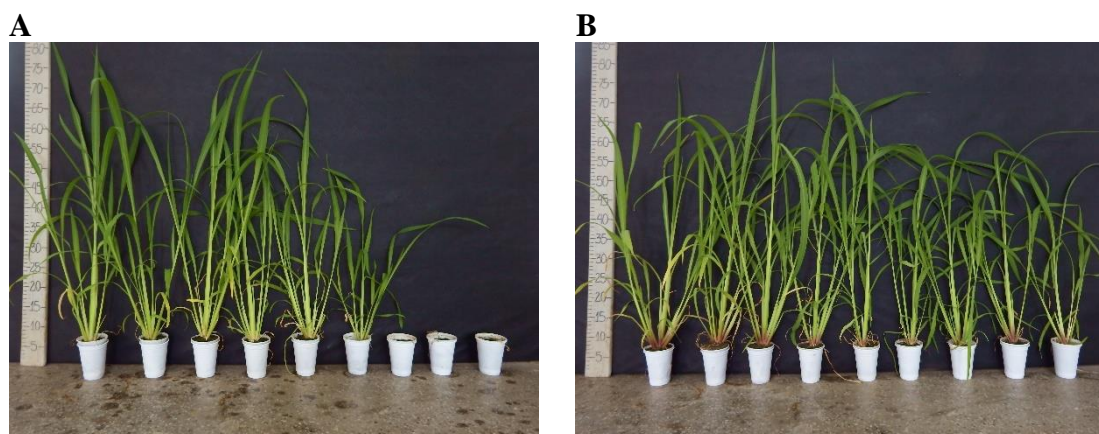


FIGURA 4. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B).



Os mecanismos de resistência aos herbicidas ACCase, identificados até então, em *Echinochloa* são devido, principalmente, ao incremento da metabolização do herbicida. *E. phyllopogon* resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl produziu cinco vezes menos fenoxaprop-ácido, e aproximadamente duas vezes mais metabólitos polares não-tóxicos em comparação com o biótipo sensível (Bakkali *et al.*, 2007). O mecanismo atribuído foi uma capacidade superior de conjugação do herbicida com glutathiona e cisteína. *E. phyllopogon* resistente ao herbicida cyhalofop-butyl também produziu cinco vezes menos cyhalofop-ácido e duas vezes mais metabólitos polares, e ainda foi verificada uma redução de 20% na absorção do herbicida no biótipo resistente (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006). Outros estudos identificaram *E. crus-galli* resistente ao cyhalofop-butyl, não sendo encontradas mutações que conhecidamente conferem resistência aos herbicidas inibidores da enzima ACCase, sendo também atribuída a resistência a mecanismos não relacionados ao local de ação (Iwakami *et al.*, 2015). Em *E. colona* resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl não foram observadas mutações no gene codificador da enzima ACCase, e o teste enzimático caracterizou a enzima como sensível (Wright *et al.*, 2016). No entanto, o uso de inibidores de enzimas P450 e GST não foram eficientes em reverter a resistência.

Outros estudos detectaram resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da ACCase, como *E. crus-galli* resistente ao cyhalofop-butyl (Rahman *et al.*, 2010), fenoxaprop-p-ethyl (Hamza *et al.*, 2012) e quizalofop-p-ethyl (Huan *et al.*, 2011). Poucos estudos, no entanto, elucidam o mecanismo de resistência de *Echinochloa* a estes herbicidas.

### 3.3.2.1 Ocorrência de incremento de metabolização via inibidor de P450

O uso de inibidor de metabolização via enzimas P450 não foi eficiente em reverter a resistência para nenhuma variável avaliada (Figura 5; Figura 6). Verificou-se um aumento no GR<sub>50</sub> do biótipo resistente, em comparação com a curva de dose-resposta sem inibidor, elevando conseqüentemente o FR (Tabela 5). Não pode ser descartado completamente o

envolvimento das enzimas P450 no caso de resistência em estudo, pois o inibidor utilizado pode não ter sido eficiente em inibir as enzimas envolvidas (Kaundun, 2014).

As enzimas P450 fazem parte da fase I de metabolização, onde catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise. Normalmente agem através da hidroxilação ou desalquilação adicionando um átomo de oxigênio à molécula (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Esta fase já foi identificada como responsável por detoxificar herbicidas e conferir resistência em outros estudos. Uma maior atividade de enzimas P450 foi descrita como responsável pela resistência múltipla de *E. phyllopogon* a fenoxaprop-p-ethyl, bispiribac-sodium e thiobencarb (Yun *et al.*, 2005). O envolvimento de enzima P450 é também amplamente conhecido para resistência de *Echinochloa* aos herbicidas inibidores da enzima ALS (Iwakami *et al.*, 2014). O envolvimento destas enzimas também está associado à resistência de outras espécies gramíneas aos herbicidas inibidores da ACCase. Genes codificadores de enzimas P450, por exemplo, foram identificados com papel chave na resistência de *Lolium rigidum* ao diclofop-methyl (Gaines *et al.*, 2014). Através de análise de RNA-Seq os autores verificaram um aumento constitutivo na expressão destes genes (Gaines *et al.*, 2014).

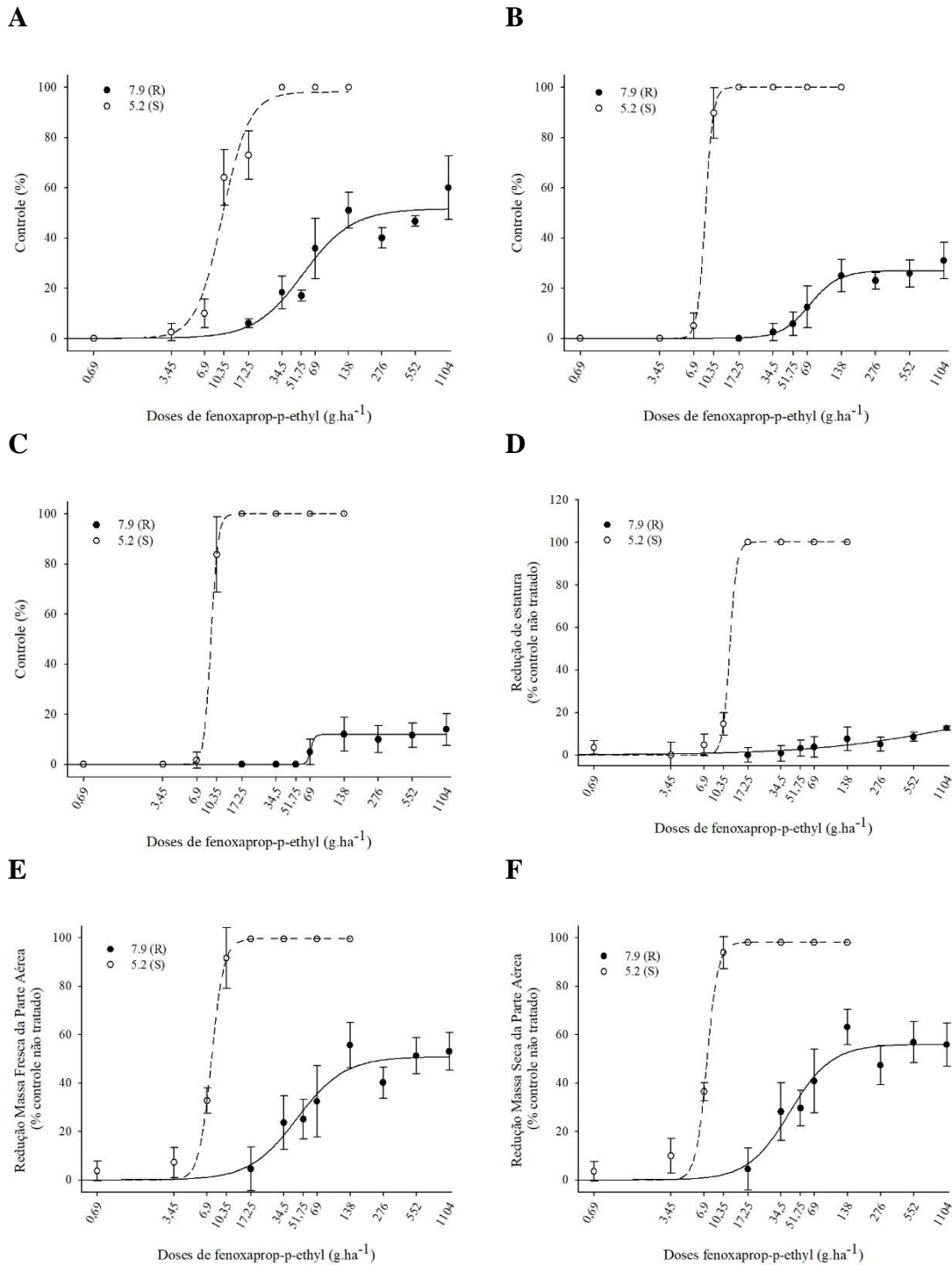


FIGURA 5. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de malathion (inibidor de enzimas P450). Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 5. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução de estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de malathion (inibidor de enzimas P450)

Biótipos	Parâmetros			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	a	b	X0	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
5.2 (S)	98,077*	-3,601*	10,028*	10,13	(10,63	9,46)	-	0,97
7.9 (R)	51,566*	-1,968*	53,565*	311,17	(369,96	253,54)	30,69*	0,88
----- Controle 14 DAT -----								
5.2 (S)	100,004*	-12,612*	8,714*	8,71	(8,72	8,70)	-	0,99
7.9 (R)	26,931*	-3,441*	72,503*	>1104			>126,68*	0,96
----- Controle 21 DAT -----								
5.2 (S)	100,003*	-14,101*	9,214*	9,21	(9,22	9,20)	-	0,99
7.9 (R)	11,916*	-25,908 <sup>ns</sup>	69,869*	>1104			>119,81*	0,96
----- Estatura -----								
5.2 (S)	100,149*	-13,438 <sup>ns</sup>	11,799*	11,79	(12,75	10,77)	-	0,99
7.9 (R)	25,788 <sup>ns</sup>	-0,661 <sup>ns</sup>	1336,999 <sup>ns</sup>	>1104			>93,58*	0,86
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	99,551*	-7,630*	7,564*	7,57	(7,69	7,43)	-	0,99
7.9 (R)	50,817*	-2,018*	45,248*	347,41	(>347,41	313,48)	45,87*	0,90
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	98,160*	-8,581*	7,328*	7,36	(7,51	7,18)	-	0,99
7.9 (R)	55,971*	-2,288*	41,226*	104,36	(135,55	97,77)	14,17*	0,92

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50%; GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%. EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

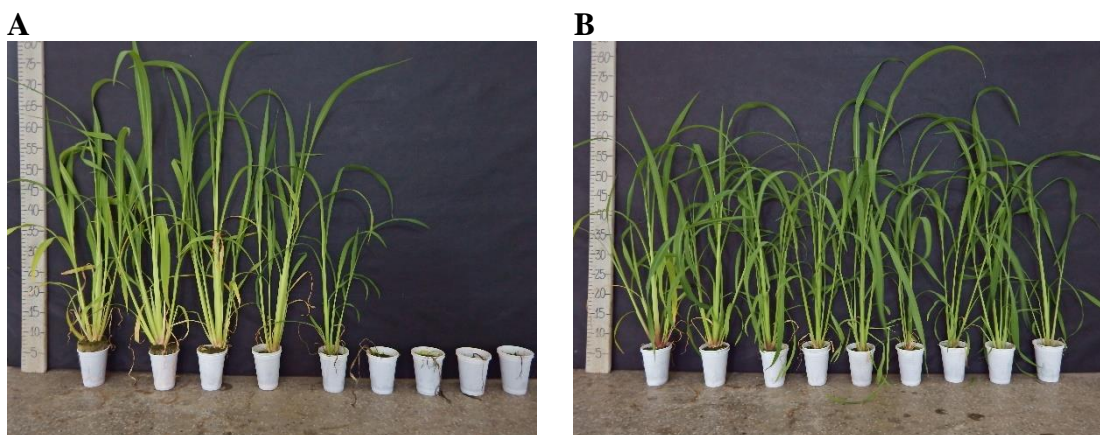


FIGURA 6. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B) com aplicação prévia de malathion (inibidor de enzimas P450).

### 3.3.2.2 Ocorrência de incremento de metabolização via inibidor de GST

O uso de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST, antecedendo o herbicida foi capaz de diminuir o FR ao fenoxaprop-p-ethyl quando avaliada a massa seca da parte aérea (Figura 7; Tabela 6). Quando aplicado o herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor e sem inibidor de metabolização o GR<sub>50</sub> foi de 72,314 g.ha<sup>-1</sup>, e o FR de 5,80. Com a aplicação do inibidor de enzimas GST antecedendo o herbicida, o GR<sub>50</sub> diminuiu para 45,287 g.ha<sup>-1</sup>, e o FR 3,62. No entanto para as demais variáveis, como controle visual, estatura de planta e massa fresca da parte aérea não foi verificado diferença estatística (Tabela 6; Figura 8).

A conjugação de herbicidas como mecanismo de resistência de *Echinochloa* aos herbicidas inibidores da enzima ACCase já foi sugerida em outros trabalhos (Bakkali *et al.*, 2007), assim como aos herbicidas quinclorac e imazethapyr (Li *et al.*, 2013; Dalazen, 2016). Essas enzimas catalisam a reação de conjugação de glutathiona com a molécula herbicida proveniente da fase I, mediada por enzimas P450 (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Os genes codificadores de enzimas GST são expressos tanto constitutivamente como induzidos em resposta aos herbicidas, bem como induzidos por protetores, que são compostos que aumentam a tolerância de cereais aos herbicidas (Labrou *et al.*, 2015; Skipsey *et al.*, 2011). Enzimas GST são codificadas por uma grande e diversa família gênica em plantas, as quais diferem em número, especificidade herbicida e indutibilidade em diferentes plantas (Labrou *et al.*, 2015). Essas enzimas também possuem papel no sistema antioxidante, no qual atuam como glutathiona peroxidases (GPX) e dehidroascorbato redutases (DHAR) (Labrou *et al.*, 2015). Neste estudo o uso do inibidor de GST não foi suficiente para levar as plantas à morte. No entanto a variável massa seca da parte aérea apontou que essas enzimas possivelmente possuem papel importante na resistência do biótipo avaliado.

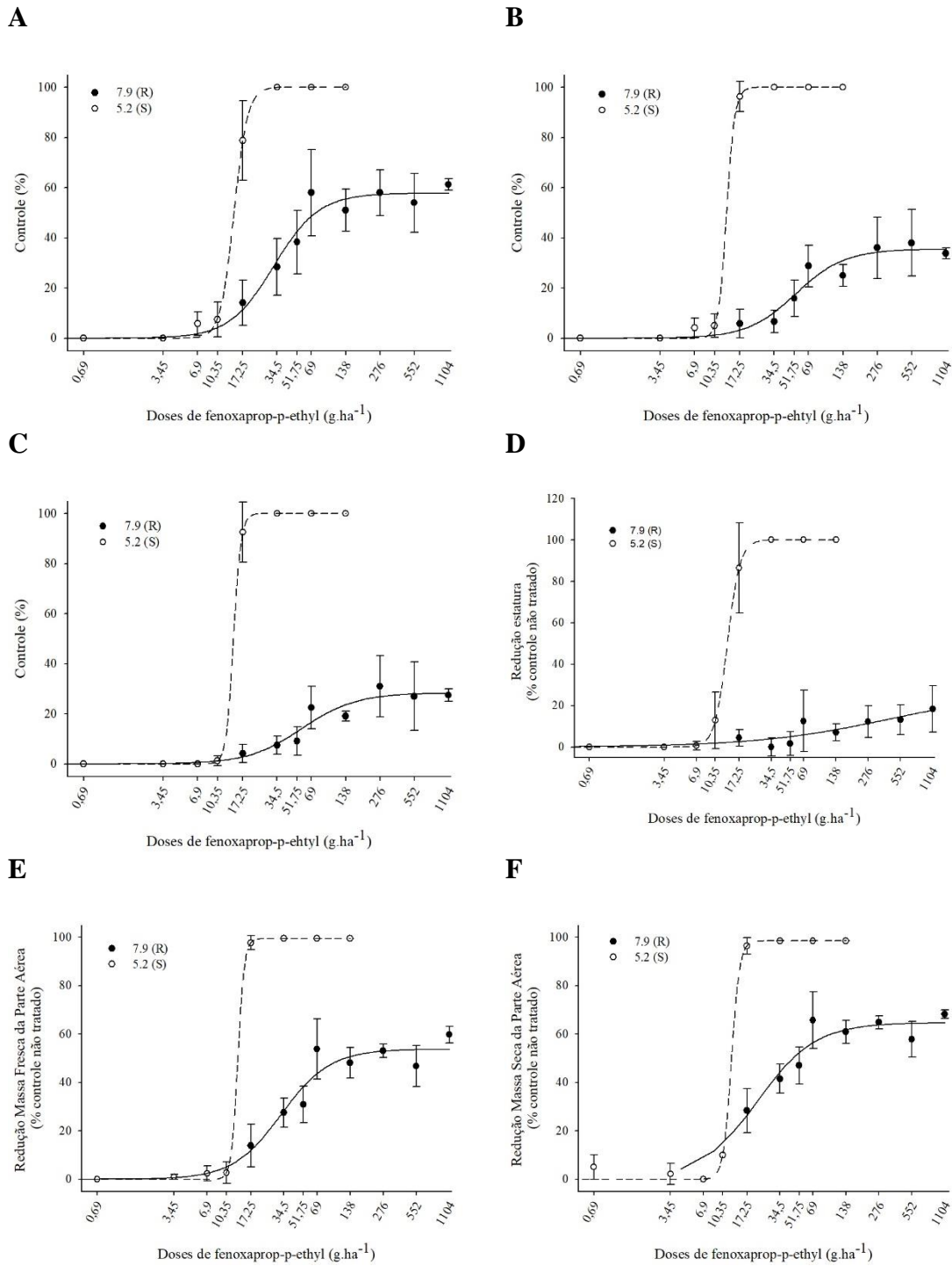


FIGURA 7. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de NBD-Cl (inibidor de enzimas GST). Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução de estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, com aplicação prévia de inibidor de enzimas GST

Biótipos	Parâmetros			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X0</i>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
5.2 (S)	100,079*	-7,305*	14,438*	14,43	(14,65	14,20)	-	0,99
7.9 (R)	57,779*	-2,204*	32,318*	75,16	(90,15	66,75)	5,20*	0,94
----- Controle 14 DAT -----								
5.2 (S)	100,011*	-12,066*	13,196*	13,19	(13,51	12,87)	-	0,99
7.9 (R)	35,502*	-2,029*	53,229*	>1104	-	-	>83,66*	0,91
----- Controle 21 DAT -----								
5.2 (S)	100,000*	-13,471*	14,315*	14,31	(14,31	14,31)	-	0,99
7.9 (R)	28,361*	-1,827*	56,819*	>1104	-	-	>77,12*	0,88
----- Estatura -----								
5.2 (S)	100,030*	-7,365*	13,417*	13,41	(13,42	13,41)	-	0,99
7.9 (R)	26,950 <sup>ns</sup>	-0,697 <sup>ns</sup>	429,741 <sup>ns</sup>	>1104	-	-	>82,28*	0,69
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	99,461*	-14,738*	13,162*	13,17	(13,50	12,84)	-	0,99
7.9 (R)	53,735*	-1,950*	32,591*	123,21	(152,40	195,89)	9,35*	0,90
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	98,501*	-11,711*	12,468*	12,50	(12,98	12,00)	-	0,99
7.9 (R)	64,665*	-1,646*	21,500*	45,28	(53,74	38,65)	3,62*	0,94

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50%; GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%; EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

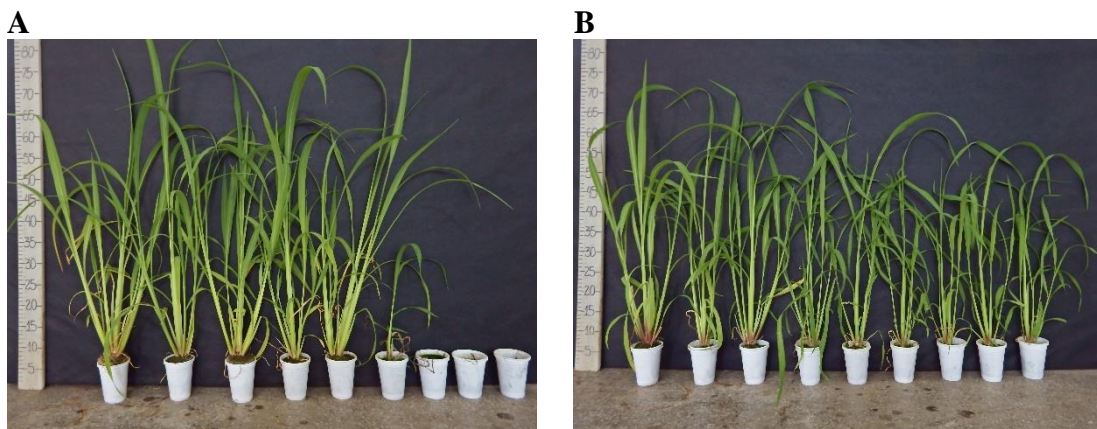


FIGURA 8. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de NBD-Cl (inibidor de enzimas GST).

### 3.3.3 Verificação da ocorrência de resistência cruzada

As variáveis analisadas apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os herbicidas avaliados de acordo com o teste ANOVA (Tabela 7). Todos os tratamentos herbicidas diferiram do controle sem aplicação para as variáveis controle visual 7, 14 DAT, MFPA e MSPA. O herbicida fenoxaprop-p-ethyl (Starice®) foi o único que apresentou plantas sobreviventes, enquanto que para os demais todas as plantas morreram. Não houve diferença visual aos 21 DAT entre a aplicação de fenoxaprop-p-ethyl (Starice®) e o controle não tratado. Os resultados indicam que não ocorreu resistência cruzada, e também não se verificou resistência a outros herbicidas de mesmo grupo químico. Isto sugere que o mecanismo de resistência a fenoxaprop-p-ethyl não esteja relacionado ao local de ação.

TABELA 7. Controle visual 7, 14 e 21 DAT (%) e massa fresca (MFPA - g) e massa seca da parte aérea (MSPA - g) do biótipo de *Echinochloa crus-galli*, resistente ao fenoxaprop-p-ethyl formulado com protetor, após aplicação de diversos herbicidas de dois grupos químicos com mecanismo inibidor da enzima ACCase

Herbicidas	7 DAT	14 DAT	21 DAT	MFPA	MSPA
Controle	0,00 D	0,00 D	0,00 C	28,385 A	4,439 A
Fenoxaprop-p-ethyl	30,00 C	20,00 C	10,00 C	23,412 B	3,318 B
Haloxifop-p-methyl	100,00 A	100,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Clodinafop-propargyl	99,20 A	100,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Cyhalofop-butyl	87,60 A	97,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Clethodim	100,00 A	100,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Sethoxydim	100,00 A	100,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Quizalofop-p-ethyl	96,00 A	99,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Fluazifop-p-butyl	100,00 A	100,00 A	100,00 A	0,055 D	0,025 D
Média	76,78	77,4	76,6	5,61	0,84
C.V.(%)	12,03	10,17	10,36	17,64	15,87

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente na coluna de acordo com o teste de Tukey 5%; CV: coeficiente de variação.

Para os mecanismos de resistência relacionados ao local de ação são descritas atualmente mutações em sete posições na sequência codificadora do domínio carboxyl-transferase da enzima ACCase: Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Cys2088, Gly2096 (Délye *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Kaundun *et al.*, 2012). Essas alterações podem



conferir resistência apenas para um ou para mais de um grupo químico (Chen et al, 2017). Recentemente a super-expressão da enzima alvo foi relacionada à resistência aos herbicidas inibidores da ACCase. A resistência de *Digitaria sanguinalis* aos herbicidas do grupo químico dos ariloxifenoxipropionatos e das ciclohexadionas ocorre pela presença de 4,9 a 7,6 vezes mais cópias do gene ACCase, e consequente super-expressão, no biótipo resistente (Laforest et al., 2017).

Até o momento não foram identificados mecanismos relacionados ao local de ação conferindo resistência aos herbicidas inibidores da enzima ACCase em *Echinochloa*. A espécie *E. crus-galli*, por exemplo, possui pelo menos três cópias ativas do gene codificador da enzima ACCase, sendo eles derivados da espécie *E. phyllopogon* (Iwakami et al., 2012). Isto é explicado pelo genoma de *E. crus-galli* ser hexaploide (6n), resultante de um cruzamento interespecífico entre *E. phyllopogon* (4n) e outra espécie diploide (2n) não identificada do gênero *Echinochloa* (Yabuno, 1966). O maior número de genes codificadores da ACCase em *E. crus-galli* indica redução da probabilidade de ocorrência de resistência por mutação na sequência codificadora da enzima, que consequentemente produziria um produto com alteração no local de ação do herbicida (Iwakami et al., 2012). Plantas com mais de duas cópias de genes codificadores da enzima alvo tendem a não adquirir a característica de resistência na presença de uma mutação em um gene, por um efeito de diluição (Iwakami et al., 2012). No entanto, este efeito pode ser diluído quando o nível de expressão de um alelo resistente é maior em relação ao suscetível (Scarabel et al., 2010; Iwakami et al., 2012).

#### 3.3.4 Curva de dose-resposta com fenoxaprop-p-ethyl formulado sem protetor

A interação entre os fatores avaliados para todas as variáveis analisadas foi significativa de acordo com o teste da ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). A morte de plantas foi verificada nas maiores doses testadas já aos 7 DAT, enquanto no experimento com aplicação de

fenoxaprop-p-ethyl formulado com protetor não foi verificada morte de plantas em nenhuma das avaliações visuais (Figura 3; Figura 9). Aos 21 DAT verificou-se morte de plantas a partir da dose  $69 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ , que refere-se à recomendada em bula de fenoxaprop-p-ethyl para controle de capim-arroz (Figura 9; Figura 10). As variáveis massa fresca e seca da parte aérea apresentaram redução do  $\text{GR}_{50}$  do biótipo resistente em comparação ao experimento com aplicação de fenoxaprop-p-ethyl formulado com protetor, enquanto o biótipo suscetível apresentou  $\text{GR}_{50}$  similar em ambos experimentos (Figura 9; Tabela 8; Figura 10). O  $\text{GR}_{50}$  da massa seca da parte aérea do biótipo resistente passou de 72,31 para 38,95, que é inferior à dose recomendada em bula. O fator de resistência consequentemente também diminuiu de 6,31 e 5,80 para 2,22 e 2,05 quando considerada a massa fresca e massa seca da parte aérea, respectivamente (Tabela 4; Tabela 8).

Embora o FR do biótipo resistente seja significativamente  $>1$ , pode-se afirmar que houve uma reversão da resistência com a aplicação de fenoxaprop-p-ethyl formulado sem o protetor (Podium®). As plantas sobreviveram apenas até a dose de 75% da recomendada, enquanto a aplicação de Starice® não foi eficiente nem mesmo com 1600% da dose. O que ocorre neste caso é uma diferença de suscetibilidade ao herbicida Podium®.

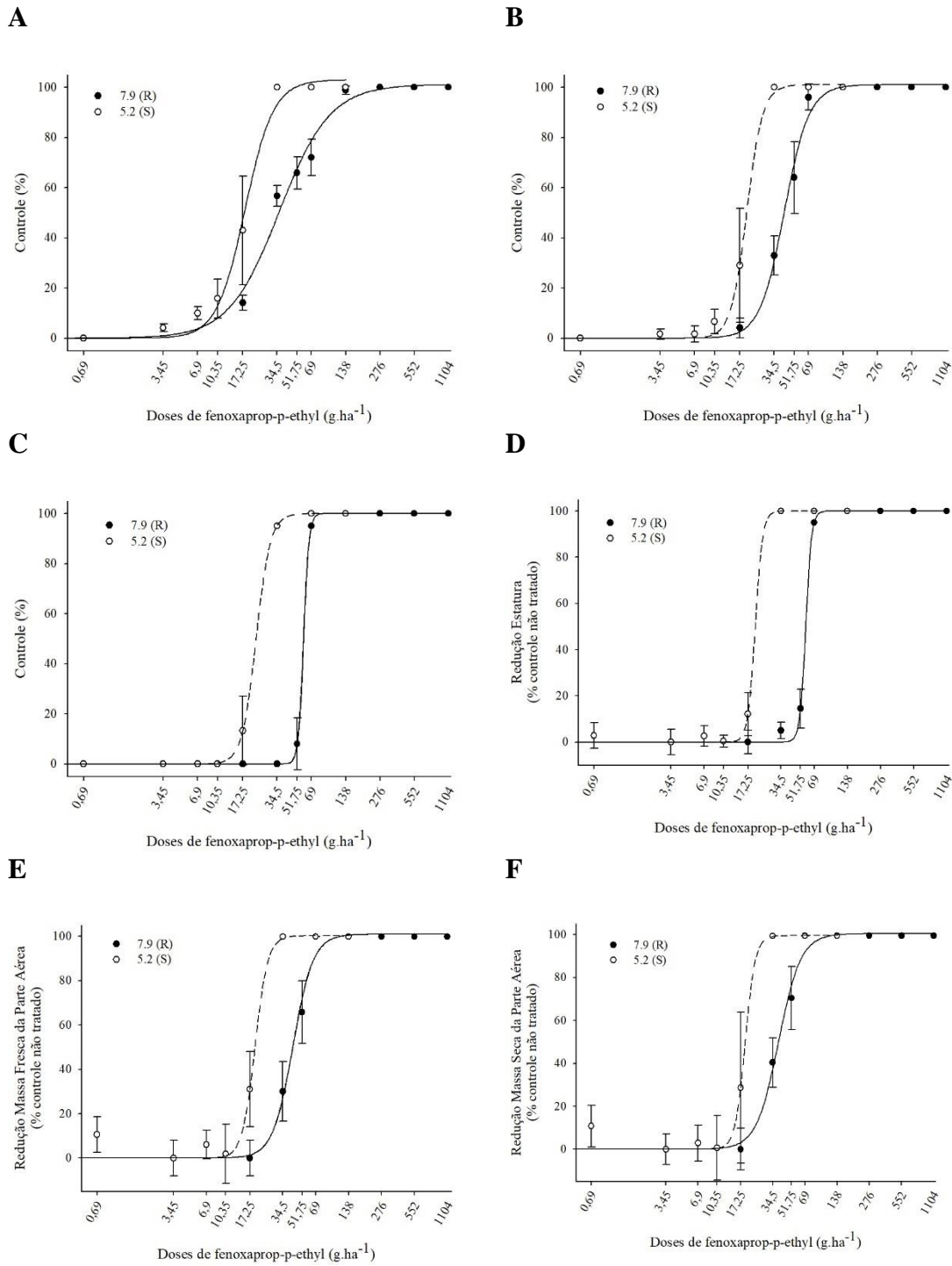


FIGURA 9. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura de planta (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação ao controle não tratado, de dois biótipos de *Echinochloa crus-galli*, um resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao fenoxaprop-p-ethyl + protetor (Starice®) após aplicação da formulação de fenoxaprop-p-ethyl sem protetor (Podium®). Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 8. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução de estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com o protetor isoxadifen-ethyl (Starice®), com aplicação da formulação de fenoxaprop-p-ethyl sem protetor (Podium®)

Biótipos	Parâmetros			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	X <sub>0</sub>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
5.2 (S)	102,8925*	-3,4850*	18,0387*	17,75	(18,33	17,02)	-	0,98
7.9 (R)	101,0637*	-1,9536*	36,0665	35,68	(37,05	33,91)	2,01*	0,98
----- Controle 14 DAT -----								
5.2 (S)	101,0002*	-6,2200*	19,8549*	19,79	(20,33	19,19)	-	0,99
7.9 (R)	100,9745*	-4,0296*	42,2796*	42,077	(43,01	41,01)	2,13*	0,99
----- Controle 21 DAT -----								
5.2 (S)	100,0077*	-6,9592*	22,5821*	22,58	(22,64	22,52)	-	0,99
7.9 (R)	100,0000*	-18,7248*	58,9599*	58,96	(58,98	58,95)	2,61*	0,99
----- Estatura -----								
5.2 (S)	100,0305*	-12,951 <sup>ns</sup>	20,1015*	20,10	(26,91	13,33)	-	0,99
7.9 (R)	100,0072*	-16,3757*	57,6739*	57,67	(58,32	57,00)	2,87*	0,99
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	100,1789*	-7,4458 <sup>ns</sup>	19,1950*	19,18	(20,22	17,55)	-	0,98
7.9 (R)	100,8611*	-4,6990*	42,6530*	42,49	(43,49	41,37)	2,22*	0,99
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	99,4595*	-9,2267 <sup>ns</sup>	19,0241*	19,04	(22,38	15,88)	-	0,99
7.9 (R)	100,3777*	-4,1851*	39,0259*	38,95	(39,93	37,83)	2,05*	0,99

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50%; GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%. EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

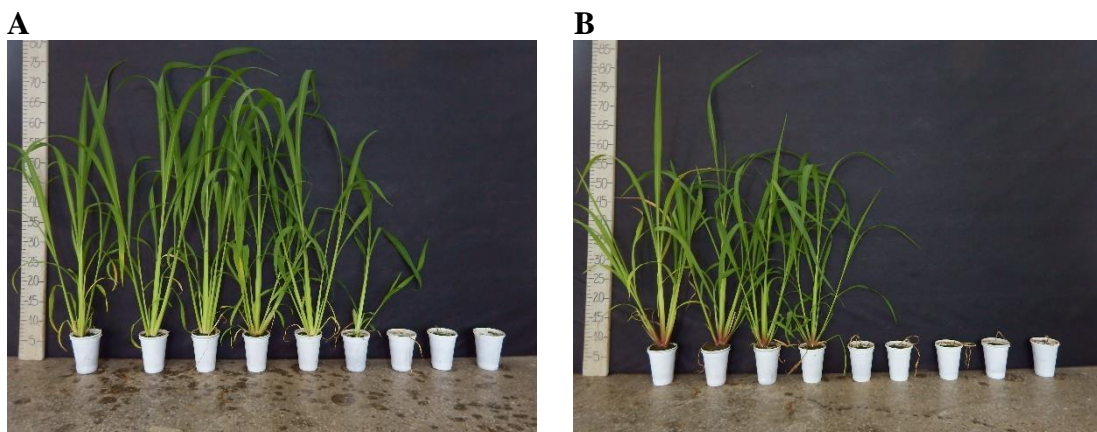


FIGURA 10. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com fenoxaprop-p-ethyl (Podium®) nas doses de 0; 0,69; 3,45; 6,9; 10,35; 17,25; 34,5; 69 e 138 g.ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0; 17,25; 34,5; 51,75; 69; 138; 276; 552 e 1104 g.ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B).

O herbicida fenoxaprop-p-ethyl recomendado para a cultura do arroz é formulado com o protetor isoxadifen-ethyl, que confere seletividade para a cultura (Lucini & Molinari, 2010; Shen *et al.*, 2017). O uso de protetores pode aumentar a tolerância de espécies cultivadas induzindo a atividade de enzimas detoxificadoras como P450, GST ou ainda outras enzimas como glucosil-transferases e transportadores ABC (Hatzios & Burgos, 2004). Foi demonstrada uma forte correlação entre a capacidade de protetores em aumentar a atividade de GST e sua eficácia em proteger de injúrias plantas de milho, arroz, sorgo e trigo de herbicidas do grupo químico das cloroacetanilidas, aumentando a baixa tolerância intrínseca destas espécies aos herbicidas devido à elevação da taxa de detoxificação através da conjugação com glutathiona (Hatzios & Burgos, 2004).

O protetor isoxadifen-ethyl pode induzir seletividade de outras culturas, além do arroz, a outros herbicidas, como aumentar a tolerância de milho ao herbicida nicossulfuron, um inibidor da enzima ALS. A aplicação de nicossulfuron com este protetor aumentou o GR<sub>50</sub> em 11 vezes comparado à aplicação sem isoxadifen-ethyl (Sun *et al.*, 2017). O mecanismo responsável pelo incremento na tolerância foi o aumento da atividade das enzimas GST em resposta ao protetor, sem no entanto aumentar o conteúdo de glutathiona (Sun *et al.*, 2017). O exato mecanismo do aumento da atividade das enzimas GST mediado pelo protetor não é completamente esclarecido, mas possivelmente está baseado na ativação transcricional dos genes codificadores destas enzimas (Hatzios & Burgos, 2004). Pelo menos oito isoenzimas GST foram caracterizadas em milho, das quais seis são constitutivas e duas induzidas por protetores (Hatzios & Burgos, 2004). Outros estudos sugerem que o protetor isoxadifen-ethyl confere seletividade ao milho com aplicação do herbicida foramsulfuron por indução de enzimas P450 (Paporisch & Rubin, 2017).

O uso de protetores pode também incrementar o metabolismo de detoxificação em plantas daninhas, assim como verificado neste estudo. A indução da resistência pela presença do protetor ocorreu apenas no biótipo resistente, e não afetou o suscetível, assim este biótipo

possui um aparato enzimático de metabolização diferenciado e mais responsivo ao protetor em relação aos suscetíveis, podendo evoluir para resistência múltipla a outros herbicidas. Outros trabalhos apontam que o uso do protetor cloquintocet-mexyl associado ao herbicida pyroxsulam, inibidor da ALS, resultou em aumento de 24 a 46% na frequência de sobrevivência em três populações de *Lolium* sp. avaliadas, comparado à aplicação de pyroxsulam isolado (Duhoux *et al.*, 2017). O uso do protetor mefenpyr-diethyl aumentou a frequência de sobrevivência em duas, dentre três populações de *Lolium* sp. quando aplicado o herbicida iodosulfuron + mesosulfuron (Duhoux *et al.*, 2017). Neste mesmo trabalho, foi observado um aumento significativo no nível de expressão de dez genes (quatro P450, uma hidrolase, uma GST, dois transportadores ABC e uma peptidase) associados aos mecanismos de resistência NRLA, quando aplicados os protetores cloquintocet-mexyl e mefenpyr-diethyl. Assim, 10 dos 19 genes estudados relacionados à resistência NRLA foram considerados responsivos aos protetores. Outro estudo, porém, sugere não haver influência evidente do protetor mefenpyr na evolução da resistência NRLA em *Alopecurus myosuroides* (Rosenhauer *et al.*, 2016).

A pressão seletiva dos herbicidas no campo pode favorecer plantas que apresentem alta expressão constitutiva de genes de metabolização, ou que possuam ativação rápida de tais genes na presença de herbicidas (Délye *et al.*, 2013). Da mesma forma, o uso de protetores associados aos herbicidas pode selecionar tais plantas mais responsivas aos compostos. Resistência NRLA evolui em populações de plantas daninhas por um aumento gradual na expressão destes genes após gerações sob a pressão seletiva de herbicidas (Délye *et al.*, 2013). O modo de reprodução de capim-arroz é autofecundação, e o acúmulo de genes de menor efeito é improvável que ocorra, ao contrário de espécies de fecundação cruzada. A autofecundação desta espécie favorece a fixação de genes de maior efeito na resistência (Iwakami *et al.*, 2014a).

Para minimizar o efeito protetor indesejado nas plantas daninhas, sem perder seletividade nas culturas, é sugerida a aplicação destes compostos no tratamento de sementes (Shen *et al.*, 2017). O composto isoxadifen-ethyl aplicado no tratamento de sementes não foi capaz de reduzir a injúria de fenoxaprop-p-ethyl em arroz cultivado, porém três derivados deste composto foram eficientes quando aplicados no tratamento de sementes (Shen *et al.*, 2017).

De forma geral, a pesquisa com protetores perdeu força em detrimento ao desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas. No entanto, com o crescente problema de resistência de plantas daninhas aos herbicidas, a formulação de herbicidas com protetores é uma estratégia que permite um novo posicionamento de herbicidas já existentes, mas que possuem limitação de utilização devido à baixa seletividade. Este novo posicionamento é desejável devido a não perspectiva de lançamento de herbicidas com novos mecanismos de ação. No entanto, a capacidade de plantas daninhas serem beneficiadas com o uso destes compostos pode prejudicar esta estratégia, o que significa necessidade de maiores conhecimentos quando do planejamento da utilização de herbicidas não somente em relação a rotação de mecanismos de ação, mas também em relação aos processos relacionados a detoxificação de herbicidas, principalmente em relação ao uso de protetores.

### **3.4 Conclusão**

A ocorrência de biótipo de *E.crus-galli* resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl formulado com protetor (Starice®) foi confirmada, com participação de enzimas GST no incremento na capacidade de detoxificação. O uso do protetor isoxadifen-ethyl na formulação do herbicida fenoxaprop-p-ethyl está relacionado à sobrevivência de plantas, considerando que a aplicação do mesmo ingrediente ativo formulado sem o protetor é capaz

de reverter a resistência. O biótipo estudado não apresenta resistência cruzada aos outros herbicidas inibidores da enzima ACCase.

### 3.5 Referências bibliográficas

- BAKKALI, Y. *et al.* Late Watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): Mechanisms Involved in the Resistance to Fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 10, p.4052-4058, 2007.
- BELFRY, K.D.; SIKKEMA, P.H. Responses of Four Types of Winter Wheat to Fenoxaprop-p-ethyl. **Agricultural Sciences**, India, v.6, n.2, p.195-200, 2015.
- BUEHRING, N. W. *et al.* Rice (*Oryza sativa*) Response and Annual Grass Control with Graminicides. **Weed Technology**, Champaign, v. 20, n. 3, p.738–744, 2006.
- CHEN, G. *et al.* Cross-resistance Patterns to Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors Associated with Different Mutations in Japanese Foxtail (*Alopecurus japonicus*). **Weed Science**, Champaign, v.65, n.4, p.444-451, 2017.
- DALAZEN, G. **Avaliação de genes relacionados ao incremento de metabolização e efeito da temperatura e da concentração de CO2 em capim-arroz resistente a imazethapyr.** 2016. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- DÉLYE, C. *et al.* Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in blackgrass. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, p.794–806, 2005.
- 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**, Malden, v.69, n.2, p.176-87, 2013.
- DUHOUX, A. *et al.* Herbicide Safeners Decrease Sensitivity to Herbicides Inhibiting Acetolactate-Synthase and Likely Activate Non-Target-Site-Based Resistance Pathways in the Major Grass Weed *Lolium* sp. (Rye-Grass). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.8, n.1310, 2017.
- EBERHARDT, D.S. *et al.* Barnyardgrass with Multiple Resistance to Synthetic Auxin, ALS and Accase Inhibitors. **Planta Daninha**, Viçosa, v.34, n.4, p.823-832, 2016.
- GAINES, T.A. *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **The Plant Journal**, Oxford, v.78, n.5, p.865-76, 2014.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.C. Non-target Site Mechanisms of Resistance to Herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.36, n.1, p.24-34, 2017.



- HAMZA, A. et al. Identification and Mechanism of *Echinochloa crus-galli* Resistance to Fenoxaprop-p-ethyl with respect to Physiological and Anatomical Differences. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 2012, n. 893204, 2012.
- HATZIOS, K.K.; BURGOS, N. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. **Weed Science**, Champaign, v.52, p.454-467, 2004.
- 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.
- IWAKAMI, S. et al. Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. **Pest Management Science**, Malden, v.68, n.7, p.1098-1106, 2012.
- IWAKAMI, S. et al. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014.
- IWAKAMI, S. et al. Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.119, p.1-8, 2015.
- KALSING, A. et al. Susceptibility of *Echinochloa* populations to cyhalofop-butyl in Southern region of Brazil and impact of the weed phenology on its efficacy of control. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47, n.4, e20160839, 2017.
- KAUNDUN, S.S. et al. Broad Resistance to ACCase Inhibiting Herbicides in a Ryegrass Population Is Due Only to a Cysteine to Arginine Mutation in the Target Enzyme. **Plos One**, San Francisco, v.7, n.6, e39759, 2012.
- KAUNDUN, S.S. Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, Malden, v.70, n.9, p.1405-1417, 2014.
- KRAEHMER, H. et al. Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. **Plant Physiology**, Rockville, v.166, n.3, p.1119-1131, 2014.
- LABROU, N.E. et al. Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.32, p.186-194, 2015.
- LAFORREST, M. et al. Acetyl-CoA carboxylase overexpression in herbicide-resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Pest Management Science**, Malden, v.73, n.11, p.2227-2235, 2017.
- 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, W. *et al.* Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, Washington, v.104, n.9, p.3627-3632, 2007.
- LUCINI, L.; MOLINARI, G.P. Residues of the herbicide fenoxaprop-P-ethyl, its agronomic safener isoxadifen-ethyl and their metabolites in rice after field application. **Pest Management Science**, Malden, v.66, n.6, p.621–626, 2010.
- MATZENBACHER *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, London, v.153, n.6, p.1044-1058, 2014.
- PAPORISCH, A.; RUBIN, B. Isoxadifen safening mechanism in sweet corn genotypes with differential response to P450-metabolized herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.138, p.22–28, 2017.
- POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.317–347, 2010.
- RAHMAN, M.M. *et al.* Study on resistant biotypes of *Echinochloa crus-galli* in Malaysia. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.4, n.2, p.107-115, 2010.
- ROSENHAUER, M. *et al.* Impact of the safener Mefenpyr-diethyl on herbicide resistance evolution in *Alopecurus myosuroides* (Huds.) biotypes. **Julius-Kühn-Archiv**, v.452, p.50-56, 2016.
- ROSINGER, C. Herbicide safeners: an overview. **Julius-Kühn-Arch.** v.443, p.516–525, 2014.
- RUIZ-SANTAELLA, J.P. *et al.* Resistance mechanisms to cyhalofop-butyl in a biotype of *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. from California. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.10, p.95-100, 2006.
- SAINI, J.P.; ANGIRAS, N.N. Evaluation of fenoxaprop-p-ethyl for weed control in direct seeded puddled rice. **Indian Journal of Weed Science**, v.34, p.131–133, 2002.
- SCARABEL, L. *et al.* Characterisation of ALS genes in the polyploid species *Schoenoplectus mucronatus* and implications for resistance management. **Pest Management Science**, Malden, v.66, n.3, p.337–344, 2010.
- SHEN, C. *et al.* Isoxadifen-Ethyl Derivatives Protect Rice from Fenoxaprop-P-Ethyl-associated Injury during the Control of Weedy Rice. **Weed Science**, Champaign, v.65, n.5, p.579-587, 2017.
- SKIPSEY, M. *et al.* Xenobiotic responsiveness of *Arabidopsis thaliana* to a chemical series derived from a herbicide safener. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.286, n.37, p.32268–32276, 2011.
- SUN, L. *et al.* Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. **PLoS ONE**, San Francisco, v.12, n.3, e0173502, 2017.

WRIGHT, A.A. *et al.* Characterization of Fenoxaprop-P-Ethyl-Resistant Junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaign, v.64, n.4, p.588-595, 2016.

YABUNO, T. Biosystematic study of the genus *Echinochloa*. **Japanese Journal of Botany**, Tokyo, v.19, p.277–323, 1966.

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

## **4 CAPÍTULO 2**

**Resistência múltipla de *Echinochloa crus-galli* aos herbicidas imazethapyr e  
quinclorac em biótipo resistente ao fenoxaprop-p-ethyl**

## RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Echinochloa crus-galli* AOS HERBICIDAS IMAZETHAPYR E QUINCLORAC EM BIÓTIPO RESISTENTE AO FENOXAPROP-P-ETHYL

### RESUMO

Atualmente são encontrados no mundo biótipos com resistência a quase todos os principais herbicidas utilizados na cultura do arroz no Brasil. Os primeiros casos de resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) no Brasil foram ao herbicida quinclorac e posteriormente com a adoção da tecnologia Clearfield® foram identificados biótipos de capim-arroz com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS + quinclorac. O uso de herbicidas inibidores da síntese da enzima ACCase passaram então a ser fundamentais para o manejo de capim-arroz, mas o seu uso contínuo tem resultado em forte pressão de seleção. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ocorrência de resistência múltipla aos herbicidas imazethapyr e quinclorac e avaliar a contribuição da metabolização como mecanismo de resistência em biótipo de capim arroz resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação climatizada. Foram utilizados um biótipo de capim-arroz com resistência a fenoxaprop-p-ethyl e um biótipo suscetível. Para a curva de dose-resposta do herbicida quinclorac foram utilizadas as doses de até 1125 e 6000 g.ha<sup>-1</sup> para os biótipo suscetível e resistente, respectivamente. Para imazethapyr as doses utilizadas foram de até 212 e 1696 g.ha<sup>-1</sup> para os biótipo suscetível e resistente, respectivamente. A ocorrência de metabolização foi avaliada através dos inibidores de enzimas GST chloro-nitrobenzofurazan (NDB-Cl) e de P450 e  $\beta$ -CAS malathion. O biótipo 7.9 apresentou resistência ao herbicida quinclorac, com FR superior a 100. Para o herbicida quinclorac, as aplicações de inibidores de enzimas P450 e GST não foram eficientes em reduzir o fator de resistência, indicando que possivelmente a resistência não esteja relacionada a incremento de detoxificação mediado por essas enzimas. O biótipo 7.9, resistente a fenoxaprop-p-ethyl, também foi resistente ao imazethapyr, com FR de aproximadamente 45. O uso de inibidor de enzimas P450 também não afetou negativamente a resistência ao imazethapyr. Todavia, quando aplicado o inibidor de enzimas GST verificou-se redução dos fatores de resistência, o que sugere um papel dessas enzimas na detoxificação deste herbicida no biótipo resistente. Foi confirmada a resistência múltipla aos herbicidas quinclorac e imazethapyr em biótipo de *E. crus-galli* com resistência a fenoxaprop-p-ethyl. Os resultados obtidos com os inibidores de metabolização malathion e NBD-CL não indicaram ocorrência de detoxificação como mecanismo de resistência ao herbicida quinclorac, enquanto para imazethapyr as enzimas GST apresentaram participação na resistência. A resistência a herbicidas em capim-arroz apresenta grande complexidade devido à ocorrência de resistência múltipla e principalmente por estar associada ao mecanismo de incremento de metabolização.

#### 4.1 Introdução

O controle químico, associado ao manejo da lâmina d'água, é amplamente utilizado nas lavouras de arroz para controle de capim-arroz. Devido ao intenso e frequente uso dos mesmos herbicidas utilizados de forma isolada e contínua, atualmente são encontrados no mundo biótipos com resistência a quase todos os principais herbicidas utilizados na cultura do arroz. No Brasil, os primeiros casos de resistência em *Echinochloa crus-galli* e *E. crus-gavonis* foram ao herbicida quinclorac, inibidor da síntese da parede celular, no ano de 1999 (Heap, 2017). O mecanismo de resistência a este herbicida ainda não é totalmente conhecido. A resistência ao quinclorac em *E. crus-galli* foi atribuída à uma maior capacidade de metabolização do herbicida mediada por enzimas P450, onde o uso de inibidores de metabolização foi capaz de reverter a resistência (Matzenbacher *et al.*, 2014). Também foi verificada detoxificação associada à maior expressão de genes *GST* como mecanismo de resistência (Li *et al.*, 2013). Porém, outros estudos apontam que a resistência de *Echinochloa* a este herbicida é conferida pela maior detoxificação de cianeto devido à uma maior expressão de genes e atividade das enzimas  $\beta$ -cianoalanina sintase ( $\beta$ -CAS) nos biótipos resistentes (Gao *et al.*, 2017).

Posterior à adoção da tecnologia Clearfield® nas lavouras orizícolas, no ano de 2009 foram identificados biótipos de *E. crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS + quinclorac (Heap, 2017). Quanto mais herbicidas de diferentes mecanismos de ação forem utilizados, as chances de selecionar biótipos resistentes são minimizadas, no entanto não eliminadas. Na safra 2011/12 foram avaliadas 421 populações de capim-arroz, oriundas de diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul, das quais 60% foram caracterizadas como resistentes a imazethapyr + imazapic, 19% resistentes ao quinclorac e 14% com resistência múltipla aos inibidores da enzima ALS + quinclorac (Matzenbacher *et al.*, 2014). No entanto, nenhuma das 421 populações sobreviveu com

aplicação de cyhalofop-butyl. A resistência de *E. crus-galli* aos herbicidas inibidores da enzima ALS foi caracterizada como relacionada e não relacionada ao local de ação. Biótipos resistentes apresentaram maior expressão dos genes *CYP81A6* e *GSTF1* após aplicação de imazethapyr, em comparação ao biótipo suscetível (Dalazen, 2016). A mutação Trp574Leu na sequência codificadora da enzima ALS foi associada à resistência aos herbicidas com ação inibidora desta enzima (Panozzo *et al.*, 2013). Além disso, foi verificada a ocorrência de ambos mecanismos, detoxificação mediada por enzimas P450 e a mutação Ser653Asn no gene ALS, conferindo resistência no mesmo biótipo (Matzenbacher *et al.*, 2014).

O uso de herbicidas inibidores da enzima ACCase seletivos para a cultura do arroz, passaram então a ser fundamentais para o manejo de capim-arroz com resistência aos herbicidas imazethapyr e quinclorac. No entanto, o seu uso contínuo também exerceu intensa pressão de seleção. Em *Echinochloa* ainda não foi identificado o mecanismo de resistência relacionado ao local de ação como responsável por conferir resistência aos herbicidas inibidores da enzima ACCase. Estudos apontam o incremento na taxa de metabolização do herbicida como mecanismo predominante até o momento (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2007). Em populações oriundas da Califórnia verificou-se cinco vezes menos produção de fenoxaprop-ácido e cyhalofop-ácido e duas vezes mais metabólitos polares não-tóxicos nos biótipos resistente em comparação aos biótipos sensíveis (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2007). Ainda, são encontrados casos de resistência múltipla de *E. crus-galli* a quinclorac + cyhalofop-butyl (Rahman *et al.*, 2010) e inibidores da ALS + cyhalofop-butyl (Iwakami *et al.*, 2015). Populações que apresentavam resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS e ao quinclorac evoluíram para resistência também aos herbicidas inibidores da enzima ACCase. Recentemente, foi identificado um biótipo de *E. crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas inibidores ALS + quinclorac + inibidores da ACCase no estado de Santa Catarina (Eberhardt *et al.*, 2016). A resistência por incremento na taxa de metabolização do herbicida pode ser o responsável por conferir resistência aos três

mecanismos de ação herbicida, visto que já foi sugerido como responsável pela resistência tanto para quinclorac como para inibidores da ALS e ACCase em outros trabalhos da literatura. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Echinochloa crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas imazethapyr e quinclorac em biótipo caracterizado com resistência ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, e avaliar a contribuição da metabolização na resistência.

#### 4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo 14/10 horas (dia/noite), na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de novembro/dezembro de 2017. Foram utilizados um biótipo potencialmente com resistência múltipla e já caracterizado como resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl (7.9) (capítulo 1), um suscetível ao imazethapyr (MOSTS-01) e outro suscetível ao quinclorac (5.2), confirmado em trabalhos pilotos. O biótipo 7.9 foi coletado em lavoura do município de Santo Antônio da Patrulha, RS, o suscetível MOSTS-01 é oriundo do município de Mostardas do Sul, RS e o suscetível 5.2 de Rio Pardo, RS. As sementes foram germinadas por imersão na solução de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$  0,2%) a  $25^{\circ}\text{C}$  por cinco dias. Após, foram transplantadas em vasos plásticos, com volume de 200 mL. Cada vaso foi perfurado e preenchido com uma mistura de solo + composto orgânico e complementação de adubação com NPK. As plantas foram mantidas em alagamento, até o nível do solo, durante todo o período após o transplante.

A aplicação dos herbicidas foi realizada em câmara de aspersão automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), ponta de pulverização TJ8002E, volume de calda foi de  $200 \text{ L ha}^{-1}$ , em plantas em estágio de 3-4 folhas. A aplicação do inibidor de metabolização via GST, 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NDB-Cl), ocorreu 48



horas antes da aplicação dos herbicidas, na dose de 270 g ha<sup>-1</sup>, diluído em acetona, volume de calda 200 L.ha<sup>-1</sup> (Wright *et al.*, 2016), enquanto que a aplicação do malathion, inibidor de enzimas P450, antecedeu em duas horas a aplicação dos herbicidas, na dose de 1000 g ha<sup>-1</sup>, volume de calda 200 L.ha<sup>-1</sup> (Matzenbacher *et al.*, 2014).

A avaliação de controle foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se uma escala percentual visual, na qual 0% corresponde ausência de injúrias e 100% significa morte da planta. Aos 21 DAT foi mensurada a estatura das plantas e foi realizada a avaliação de massa fresca da parte aérea (MFPA). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada, 60 °C por sete dias, e após foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância foram ajustados pelo modelo de regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y=a/1+(x/x_0)^b$ . Os dados de controle visual foram transformados ( $\sqrt{x+1}$ ) para atenderem os pressupostos da ANOVA. Para a determinação dos valores de C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub>, o y da equação foi substituído por 50 (50% de controle). C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub> representam a dose necessária para atingir 50% de controle e 50% de redução de crescimento, respectivamente.

#### 4.2.1 Resistência ao quinclorac

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2x9x3, para o biótipo resistente, e 2x8x3 para o suscetível, em delineamento completamente casualizado. Foram utilizados dois biótipos, sendo um resistente (7.9) e um suscetível (5.2). O biótipo resistente foi aspergido com nove doses do herbicida quinclorac (Facet® 500 g.kg<sup>-1</sup>): 0; 93,75; 187,5; 281,25; 375,0; 750,0; 1500,0; 3000,0 e 6000,0 g.ha<sup>-1</sup>, que correspondem a 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800 e 1600% da dose recomendada. O biótipo suscetível, por sua vez foi aspergido com doses inferiores: 0; 37,5; 93,75; 187,5; 281,25; 375,0; 750,0 e 1125,0 g.ha<sup>-1</sup>, que correspondem a 0, 10, 25, 50, 75, 100, 200 e 300% da dose recomendada. Ambos biótipos receberam

tratamentos sem e com aplicação de malathion ou NBD-Cl previamente ao herbicida quinclorac. Foi adicionado óleo mineral Assist (0,5% v/v) à calda de pulverização. Cada tratamento possuiu seis repetições.

#### 4.2.2 Resistência ao imazethapyr

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2x9x3, em delineamento completamente casualizado. Foram utilizados dois biótipos, sendo um resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01). O biótipo resistente foi aspergido com nove doses do herbicida imazethapyr (Imazetapir Plus Nortox®, 106 g.L<sup>-1</sup>): 0; 26,5; 53,0; 79,5; 106,0; 212,0; 424,0; 848,0 e 1696,0 g.ha<sup>-1</sup>, que correspondem a 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800 e 1600% da dose recomendada. O biótipo suscetível, por sua vez foi aspergido com as seguintes doses: 0; 1,06; 5,3; 10,6; 15,9; 26,5; 53,0; 106,0 e 212,0 g.ha<sup>-1</sup> que correspondem a 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100 e 200% da dose recomendada. Ambos biótipos receberam tratamentos sem e com aplicação de malathion ou NBD-Cl previamente ao herbicida imazethapyr. Foi adicionado adjuvante Dash (0,5% v/v) à calda de pulverização. Cada tratamento possuiu seis repetições.

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Resistência ao herbicida quinclorac

As variáveis analisadas apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os herbicidas avaliados de acordo com o teste ANOVA. A aplicação do herbicida quinclorac isolado, sem aplicação prévia de inibidor de metabolização, resultou C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub> acima da dose máxima testada, que foi 6000 g.ha<sup>-1</sup>, para o biótipo resistente em todas as variáveis avaliadas (7.9) (Figura 1; Tabela 1; Figura 2). Para o biótipo suscetível (5.2) as doses de C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub> foram aproximadamente de 40 g.ha<sup>-1</sup>. Desta forma os fatores de

resistência (FR) foram acima de 120, o que indica um alto nível de resistência do biótipo 7.9 ao herbicida quinclorac.

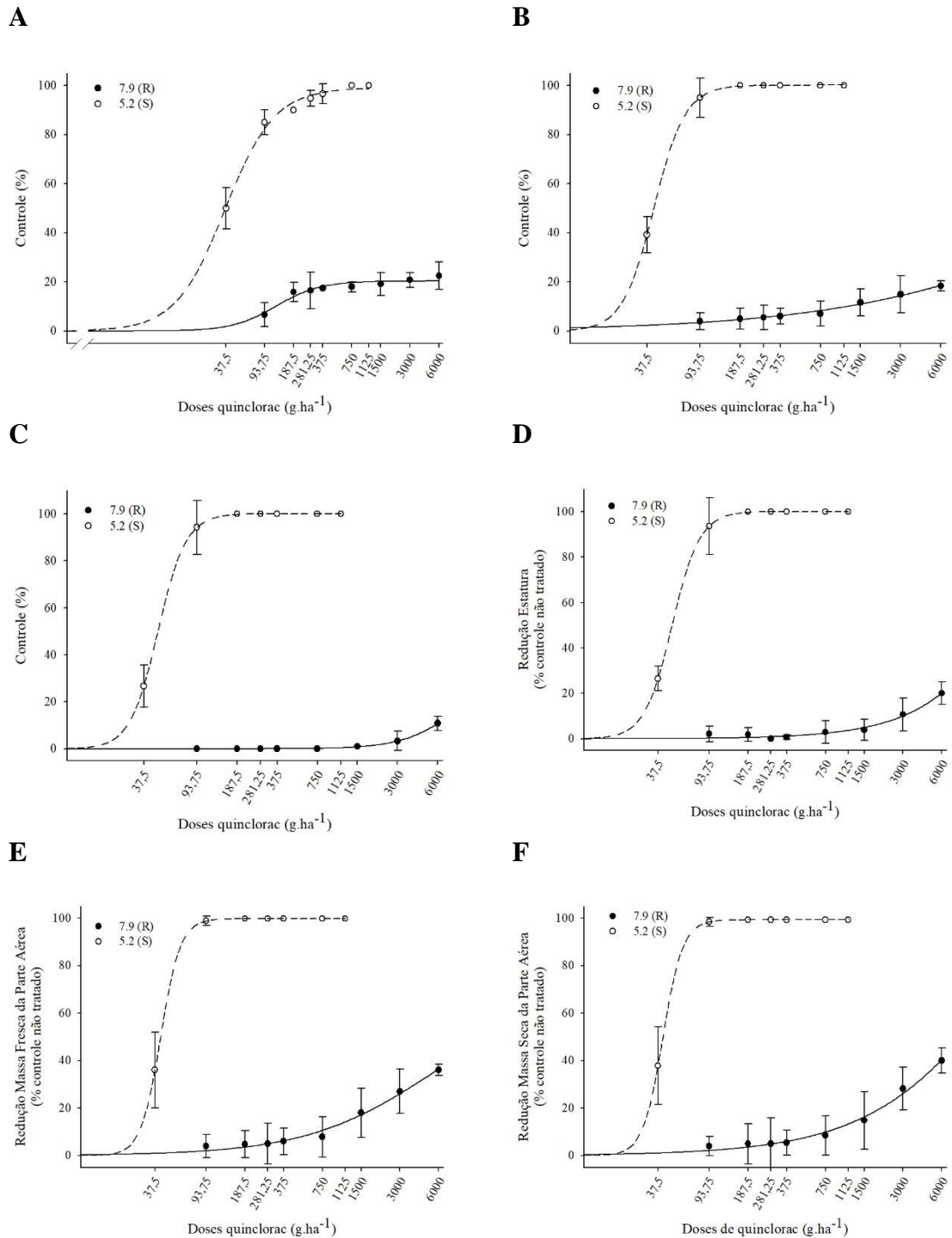


FIGURA 1. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação ao controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) após aplicação de quinclorac, sem aplicação prévia de inibidores de metabolização. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 1. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) após aplicação do herbicida quinclorac, sem o uso de inibidores de metabolização.

Biótipos	Parâmetros da equação			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>			R <sup>2</sup>
	a	b	X <sub>0</sub>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	
----- Controle 7 DAT -----							
5.2 (S)	98,972*	-1,693*	36,473*	36,92	(38,19	35,47)	0,99
7.9 (R)	20,358*	-1,905*	123,387*	> 6000			>162,50 0,95
----- Controle 14 DAT -----							
5.2 (S)	100,099*	-3,684*	42,280*	42,25	(42,33	42,18)	0,99
7.9 (R)	90,591 <sup>ns</sup>	-0,450*	120079,085 <sup>ns</sup>	> 6000			>141,98 0,98
----- Controle 21 DAT -----							
5.2 (S)	100,083*	-4,131*	47,920*	47,90	(47,99	47,80)	0,99
7.9 (R)	36,366*	-2,059*	9098,787*	> 6000			>125,25 0,99
----- Estatura -----							
5.2 (S)	100,097*	-4,038*	48,269*	48,24	(48,35	48,14)	0,99
7.9 (R)	315,575 <sup>ns</sup>	-1,041*	78994,850 <sup>ns</sup>	> 6000			>124,36 0,96
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----							
5.2 (S)	99,774*	-5,644*	41,501*	41,53	(41,54	41,52)	0,99
7.9 (R)	676,312 <sup>ns</sup>	-0,669*	431369,242*	> 6000			>144,45 0,97
----- Massa Seca da Parte Aérea -----							
5.2 (S)	99,319*	-5,593*	40,905*	41,01	(41,01	40,99)	0,99
7.9 (R)	70,964*	-0,862*	5632,534 <sup>ns</sup>	> 6000			>146,32 0,98

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50% (g.ha<sup>-1</sup>); GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50% (g.ha<sup>-1</sup>); EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

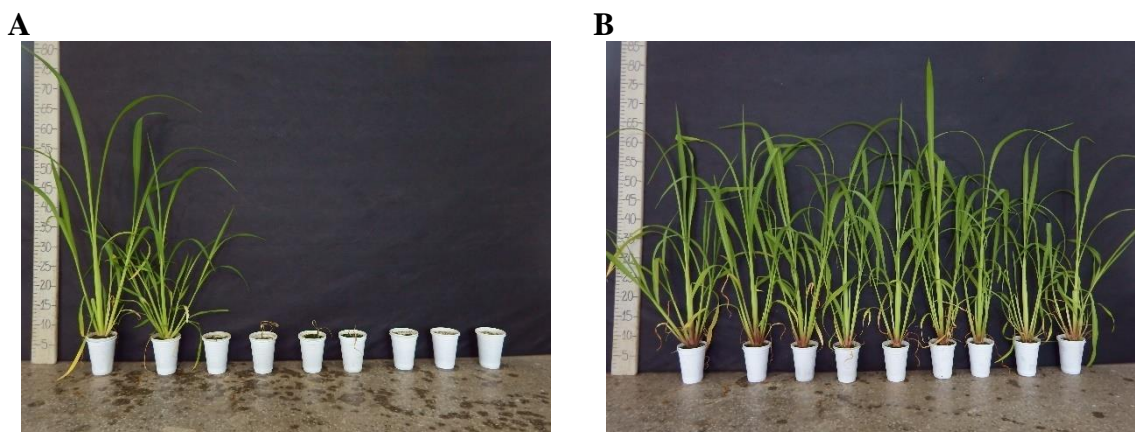


FIGURA 2. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 37,5, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750 e 1125 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750, 1500, 3000 e 6000 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), sem aplicação prévia de inibidor de metabolização.

O uso de malathion, um conhecido inibidor de metabolização via enzimas P450, não foi eficiente em reverter a resistência ao herbicida quinclorac no biótipo 7.9. As doses de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  do biótipo suscetível diminuíram em relação às encontradas no experimento sem aplicação de inibidor de metabolização. No entanto para o biótipo resistente as doses que proporcionaram 50% de controle e redução de crescimento mantiveram-se acima da dose máxima testada (Figura 3; Tabela 2; Figura 4). Esta combinação gerou FR ainda maiores, acima de 1000. As enzimas P450 são responsáveis por reações de oxidação, redução e hidrólise. Normalmente agem através da hidroxilação ou desalquilação adicionando um átomo de oxigênio à molécula (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Essa fase geralmente é responsável por detoxificar compostos, e já foi descrita como mecanismo de resistência a diversos outros herbicidas, como inibidores da enzima ACCase e ALS, entre outros (Matzenbacher *et al.*, 2014; Gaines, *et al.*, 2014). A resistência causada por incremento de detoxificação do herbicida quinclorac por ação de enzimas P450 foi sugerida em dois biótipos de *E. crus-galli*, e foi revertida com aplicação de malathion, PBO e ABT, todos inibidores de enzimas P450 (Matzenbacher *et al.*, 2014). Ressalta-se que a aplicação de malathion pode inibir outras enzimas como a  $\beta$ -CAS, que possui papel importante na detoxificação do cianeto (Yasuor *et al.*, 2012). Segundo estudos anteriores, o quinclorac é supostamente resistente à metabolização em plantas, e a resistência em plantas daninhas e seletividade em culturas não são relacionadas à desintoxicação diferencial deste herbicida (Chism *et al.*, 1991; Grossman & Kwiatkowski, 2000).

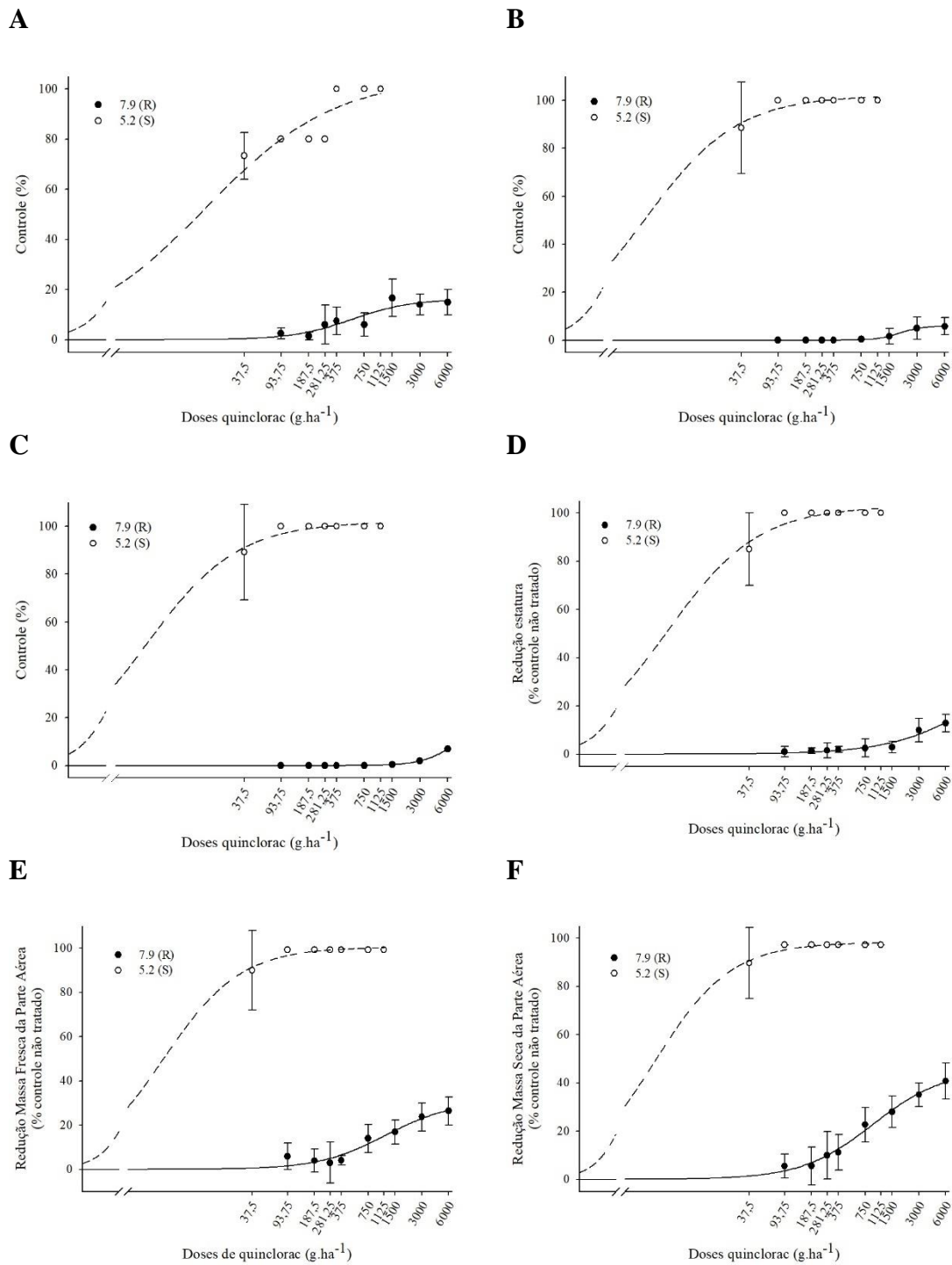


FIGURA 3. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação ao controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) após aplicação de quinclorac, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) após aplicação do herbicida quinclorac, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450.

Biótipos	Parâmetros da equação			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X0</i>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
5.2 (S)	104,815*	-0,617*	14,170 <sup>ns</sup>	12,21	(10,57	7,08)		0,97
7.9 (R)	16,258*	-1,334 <sup>ns</sup>	543,419 <sup>ns</sup>	> 6000			>491,457	0,83
----- Controle 14 DAT -----								
5.2 (S)	101,956*	-0,874*	3,472*	3,32	(4,01	2,56)		0,99
7.9 (R)	5,957*	-3,495*	1921,651*	> 6000			>1805,34	0,99
----- Controle 21 DAT -----								
5.2 (S)	101,817*	-0,881*	3,293*	3,16	(3,79	2,48)		0,99
7.9 (R)	19,843*	-2,275*	7834,635*	> 6000			>1897,34	0,99
----- Estatura -----								
5.2 (S)	102,666*	-0,855*	4,605*	4,33	(5,44	3,03)		0,99
7.9 (R)	42,821 <sup>ns</sup>	-0,886*	14898,066 <sup>ns</sup>	> 6000			>1384,53	0,93
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	100,423*	-1,013*	3,832*	3,80	(4,60	2,95)		0,99
7.9 (R)	30,734*	-1,151*	1160,377 <sup>ns</sup>	> 6000			>1578,55	0,93
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	98,148*	-1,025*	3,290*	3,41	(4,02	2,78)		0,99
7.9 (R)	45,579*	-1,077*	910,884*	> 6000			>1757,54	0,98

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50% (g.ha<sup>-1</sup>); GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50% (g.ha<sup>-1</sup>); EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

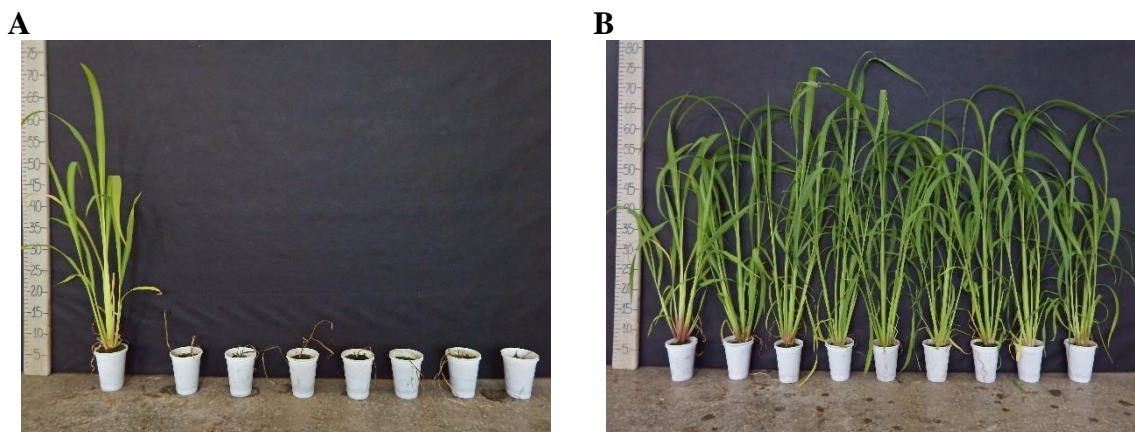


FIGURA 4. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 37,5, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750 e 1125 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750, 1500, 3000 e 6000 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450.

A aplicação de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST, também não foi eficiente em reverter a resistência ao herbicida quinclorac no biótipo 7.9. Não foi alcançada a dose de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  com as doses testadas (Figura 5; Tabela 3; Figura 6). Os FR das variáveis de controle visual e estatura de planta foram acima de 100, enquanto para massa fresca e seca da parte aérea o FR foi acima de 1707,57 e 2125,35, respectivamente. As enzimas GST catalisam a reação de conjugação de glutathiona com a molécula herbicida proveniente da fase I, mediada por enzimas P450 (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Os genes codificadores de enzimas GST são expressos tanto constitutivamente como induzidos em resposta a herbicidas (Labrou *et al.*, 2015; Skipsey *et al.*, 2011). Enzimas GST apresentaram 1,5 vezes maior expressão do gene *GST1* nas folhas de biótipos resistentes ao herbicida quinclorac, mesmo na ausência do herbicida (Li *et al.*, 2013). Seis horas após a aplicação do quinclorac a expressão deste gene foi seis vezes superior no resistente. Estas enzimas são conhecidamente envolvidas em processos de detoxificação que conferem resistência a outros herbicidas em *E. crus-galli*, como inibidores da enzima ALS e ACCase (Dalazen, 2016; Ruiz-Santaella *et al.*, 2006).



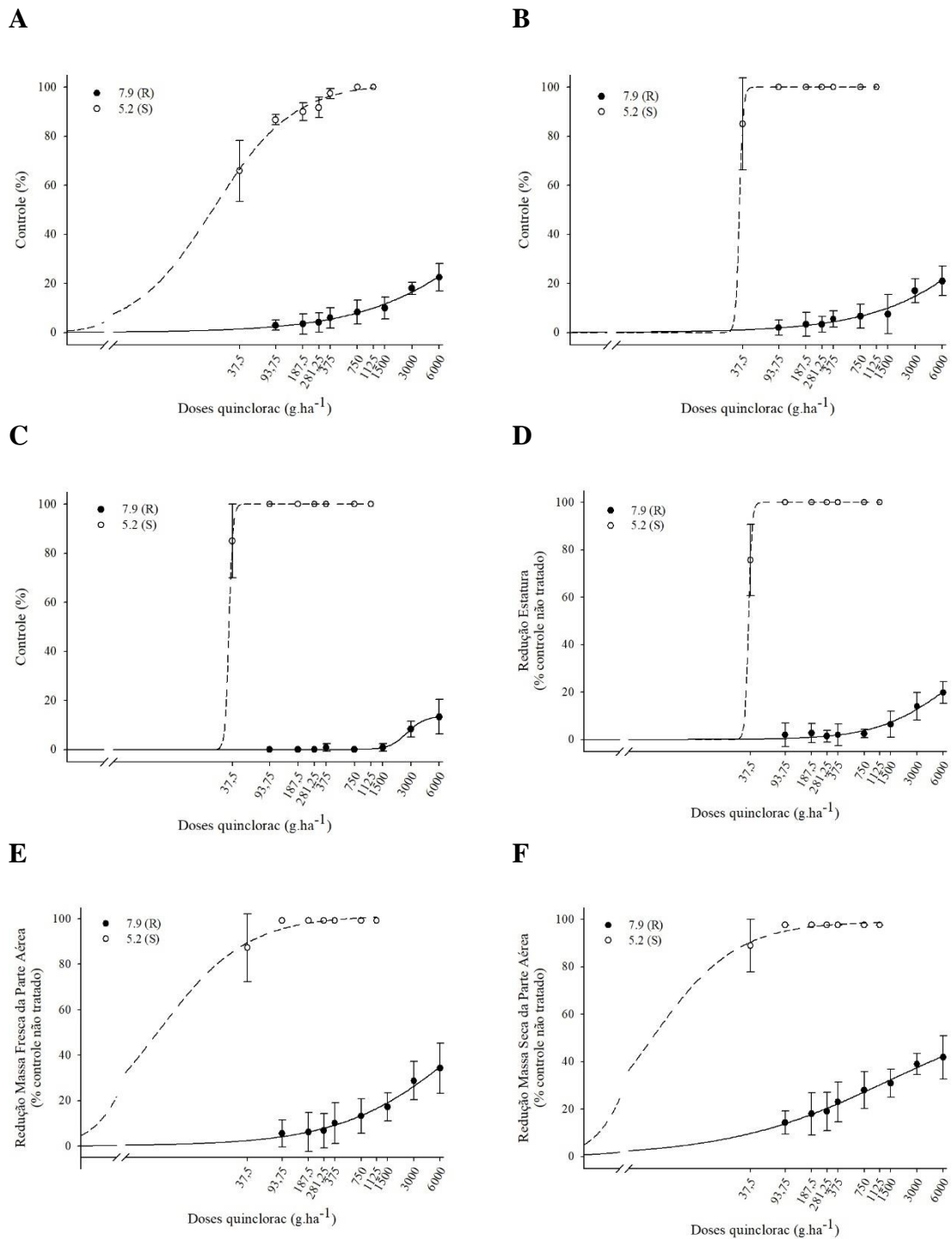


FIGURA 5. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (5.2) após aplicação de quinclorac, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 3. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (5.2) após aplicação do herbicida quinclorac, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST.

Biótipos	Parâmetros da equação			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	a	b	X <sub>0</sub>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
5.2 (S)	101,575*	-0,981*	19,425*	18,82	(20,18	16,77)		0,99
7.9 (R)	83,971 <sup>ns</sup>	-0,607*	30201,883 <sup>ns</sup>	> 6000			>318,79	0,98
----- Controle 14 DAT -----								
5.2 (S)	100,00*	-21,230*	34,557*	34,55	(34,61	34,50)		0,99
7.9 (R)	125,947 <sup>ns</sup>	-0,624*	75205,796 <sup>ns</sup>	> 6000			>173,62	0,95
----- Controle 21 DAT -----								
5.2 (S)	100,00*	-21,230*	34,557*	34,55	(34,616	34,50)		0,99
7.9 (R)	13,691*	-4,582*	2724,445*	> 6000			>173,62	0,99
----- Estatura -----								
5.2 (S)	100,00*	-22,184*	35,633*	35,63	(35,64	35,61)		0,99
7.9 (R)	42,471 <sup>ns</sup>	-1,060*	6604,555 <sup>ns</sup>	> 6000			>168,38	0,96
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	101,322*	-0,867*	3,621*	3,51	(4,28	2,67)		0,99
7.9 (R)	89,176 <sup>ns</sup>	-0,622*	12137,172 <sup>ns</sup>	> 6000			>1707,57	0,98
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
5.2 (S)	98,971*	-0,904*	2,758*	2,82	(3,30	2,31)		0,99
7.9 (R)	63,236*	-0,473*	1348,882 <sup>ns</sup>	> 6000			>2125,35	0,99

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50% (g.ha<sup>-1</sup>); GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50% (g.ha<sup>-1</sup>); EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

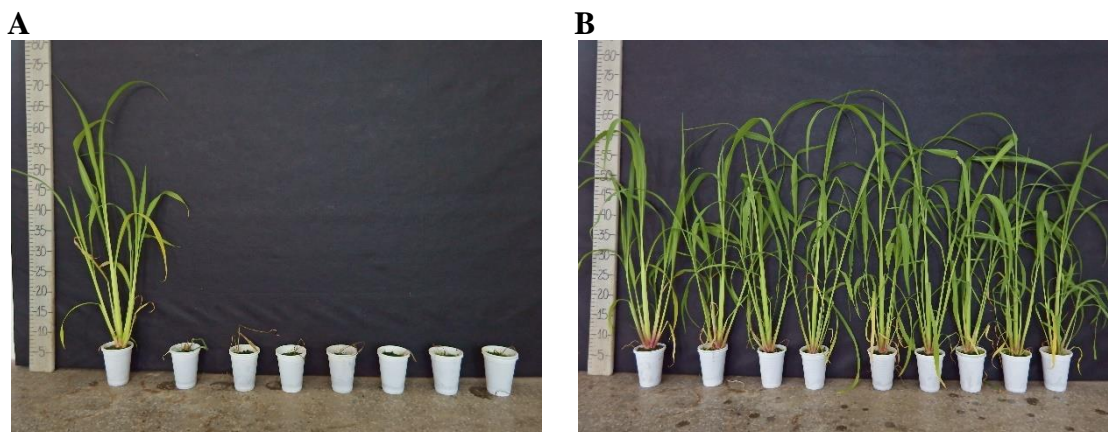


FIGURA 6. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com quinclorac nas doses de 0, 37,5, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750 e 1125 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 93,75, 187,5, 281,25, 375, 750, 1500, 3000 e 6000 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST.

O mecanismo de resistência ao herbicida quinclorac por muito tempo gerou divergências e especulações. Alguns estudos sugerem que a resistência poderia estar associada à uma possível diferença de translocação, onde um biótipo suscetível apresentaria menor translocação do herbicida para fora da folha tratada (Lovelace *et al.*, 2007). Outros estudos ainda sugerem a detoxificação diferencial via enzimas P450, pelo fato dos inibidores serem capazes de reverter a resistência (Matzenbacher *et al.*, 2014) e via enzimas GST pelo fato da expressão do gene *GST1* no biótipo resistente ser 1,5 vezes maior, mesmo na ausência do herbicida, e seis vezes maior após a aplicação do quinclorac (Li *et al.*, 2013). No mesmo sentido, estudos da expressão de genes de detoxificação em plantas de arroz, ao qual o quinclorac é seletivo, indicaram maior expressão de genes das famílias P450, GST e UDP-glycosyltransferase após a aplicação do herbicida (Xu *et al.*, 2015).

O quinclorac induz a biossíntese de etileno através da via do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC). Este processo produz um co-produto tóxico, o cianeto, que é a principal forma de ação do quinclorac. A produção de ACC induzida pelo quinclorac é inicialmente produzida nas raízes e, então, o ACC acumulado é transportado da raiz para a parte aérea, onde promove a geração de etileno e cianeto. Devido a isso, o crescimento da parte aérea é mais suscetível aos danos causados pelo quinclorac em relação à raiz (Grossman, 1996; Grossman & Kwiatkowski, 1995).

Conhecendo o modo de ação do quinclorac, outras enzimas de detoxificação podem estar envolvidas na resistência, além das P450 e GST, como a  $\beta$ -cianoalanina sintase ( $\beta$ -CAS), que é responsável por detoxificar o cianeto (Gao *et al.*, 2017). Atualmente, o mecanismo mais aceito de resistência ao herbicida quinclorac é a detoxificação do cianeto mediada por esta enzima. A  $\beta$ -CAS mitocondrial catalisa a conjugação de cianeto com cisteína para formar sulfeto de hidrogênio e  $\beta$ -cianoalanina, que por sua vez é metabolizado em asparagina (Yip & Yang, 1988). A aplicação de malathion inibiu a atividade da enzima  $\beta$ -CAS e reverteu a resistência de *E. phyllopogon* ao quinclorac (Yasuor *et al.*, 2012). A

resistência em biótipo de *E. crus-galli* também foi associada à enzima  $\beta$ -CAS. O biótipo suscetível apresentou uma menor atividade da enzima  $\beta$ -CAS em comparação aos dois biótipos resistentes avaliados (Gao *et al.*, 2017). *Digitaria ischaemum* resistente ao quinclorac também apresentou maior atividade da enzima  $\beta$ -CAS, enquanto o suscetível acumulou três vezes mais etileno e mais cianeto em comparação ao resistente (Abdallah *et al.*, 2006). Populações resistentes com maior atividade de  $\beta$ -CAS podem evitar ou reduzir a toxidez por cianeto, induzido pela aplicação de quinclorac. Enquanto em biótipos suscetíveis o acúmulo de cianeto pode aumentar a atividade de ACC sintase, o que pode levar à maior produção de etileno e cianeto (Gao *et al.*, 2017). A inibição da enzima ACC sintase reduziu em 39% a fitointoxicação e em 89% a produção de etileno em *Digitaria ischaemum* (Abdallah *et al.*, 2006). Estudos verificaram ainda a ocorrência da mutação Met295Lys na sequência gênica codificadora da enzima  $\beta$ -CAS mais ativa de dois biótipos de *E. crus-galli* resistentes ao quinclorac, em comparação à sequência do biótipo suscetível. Esta substituição de aminoácidos é também verificada na sequência gênica de arroz, ao qual o quinclorac apresenta seletividade, e pode estar associada à maior atividade da enzima (Gao *et al.*, 2017).

No presente estudo, não foi verificada reversão da resistência ao herbicida quinclorac, nem mesmo redução do FR, após a aplicação de inibidores de metabolização. Isto corrobora com outros estudos que sugerem que quinclorac é pouco sensível à metabolização (Chism *et al.*, 1991; Grossman & Kwiatkowski, 2000). A resistência do biótipo 7.9 é alta, sendo que o GR<sub>50</sub> foi superior a 16 vezes a dose recomendada em bula para o controle de *E. crus-galli*. O malathion pode inibir enzimas P450, como tradicionalmente é conhecido, e também a enzima  $\beta$ -CAS (Yasuor *et al.*, 2012). Desta forma, provavelmente o mecanismo de resistência deste biótipo não está relacionado à metabolização do herbicida mediada pelas enzimas P450 e GST, e nem detoxificação do cianeto por enzimas  $\beta$ -CAS. Porém, os inibidores utilizados podem não ser eficientes em

inibir as enzimas envolvidas no processo, visto que a família de enzimas P450 e GST são grandes e diversas.

#### 4.3.2 Resistência ao herbicida imazethapyr

As variáveis analisadas apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os herbicidas avaliados de acordo com o teste ANOVA. A curva de dose-resposta com aplicação do herbicida imazethapyr confirmou o biótipo 7.9 como resistente. O  $GR_{50}$  deste biótipo foi de 177,52 e 134,06  $g \cdot ha^{-1}$  para as variáveis massa fresca e massa seca da parte aérea, respectivamente, enquanto o biótipo suscetível apresentou  $GR_{50}$  inferiores a 4,0  $g \cdot ha^{-1}$ , produzindo FR de 45,38 e 47,50 (Figura 7; Tabela 4). A maior dose testada, correspondente a 16 vezes a dose recomendada, atingiu controle de 100% para o biótipo 7.9 aos 21 DAT (Figura 8). No entanto, para a dose correspondente a 8 vezes a recomendada as plantas sobreviveram, embora com considerável redução de crescimento.

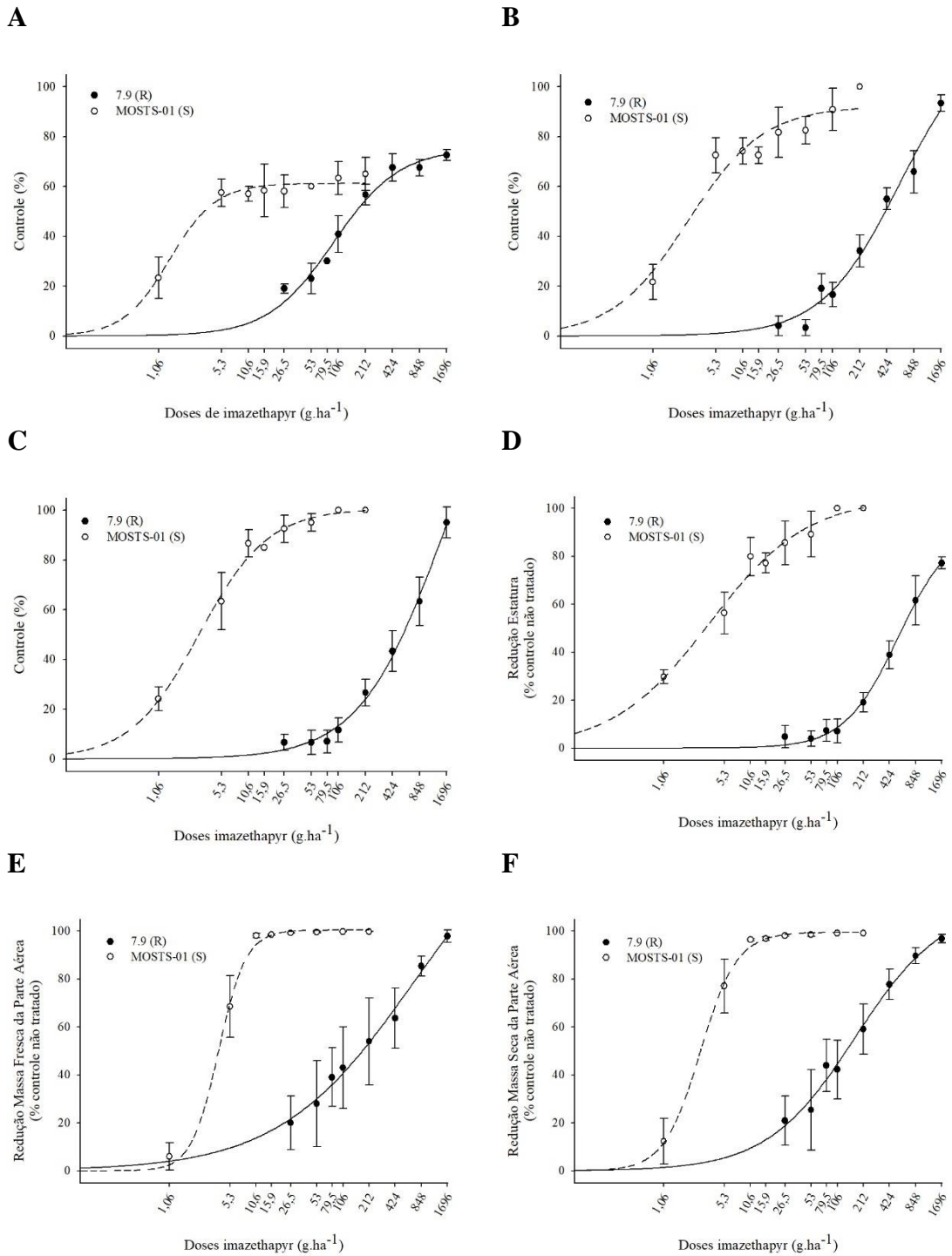


FIGURA 7. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (MOSTS-01) após aplicação de imazethapyr, sem aplicação prévia de inibidor de metabolização. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01) após aplicação do herbicida imazethapyr, sem aplicação prévia de inibidor de metabolização.

Biótipos	Parâmetros da equação			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	X <sub>0</sub>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle 7 DAT -----								
MOSTS-01 (S)	61,201*	-1,683*	1,396*	3,39	(4,37	2,75)		0,98
7.9 (R)	75,185*	-1,187*	93,526*	166,62	(180,25	152,10)	49,04	0,98
----- Controle 14 DAT -----								
MOSTS-01 (S)	92,119*	-1,033*	2,585*	3,05	(3,50	2,40)		0,95
7.9 (R)	121,608*	-1,009*	582,690 <sup>ns</sup>	408,25	(475,58	325,14)	133,76	0,97
----- Controle 21 DAT -----								
MOSTS-01 (S)	100,542*	-1,137*	2,997*	2,96	(3,11	2,79)		0,99
7.9 (R)	177,679*	-0,949*	1488,490 <sup>ns</sup>	554,31	(645,31	463,23)	186,72	0,99
----- Estatura -----								
MOSTS-01 (S)	104,395*	-0,772*	3,582*	3,21	(3,27	2,96)		0,98
7.9 (R)	93,121*	-1,397*	538,963*	599,19	(613,58	576,98)	186,54	0,99
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
MOSTS-01 (S)	100,347*	-2,7577*	3,921*	3,91	(4,09	3,71)		0,99
7.9 (R)	157,523*	-0,5603*	696,228 <sup>ns</sup>	177,52	(230,60	124,44)	45,38	0,99
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
MOSTS-01 (S)	99,418*	-2,067*	2,806*	2,82	(2,90	2,73)		0,99
7.9 (R)	111,449*	-0,852*	170,748*	134,06	(136,29	123,78)	47,50	0,98

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50% (g.ha<sup>-1</sup>); GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50% (g.ha<sup>-1</sup>); EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

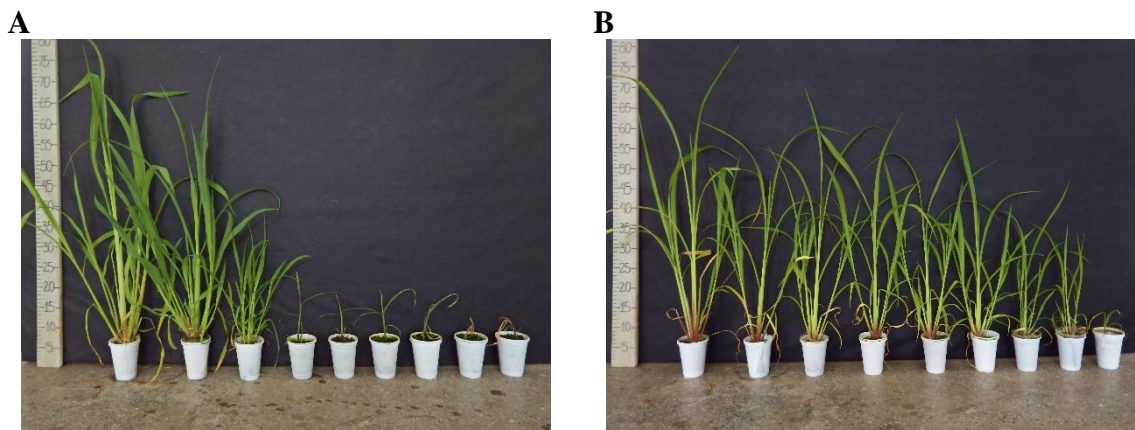


FIGURA 8. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com imazethapyr nas doses de 0, 1,06, 5,3, 10,6, 15,9, 26,5, 53, 106 e 212 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 26,5, 53, 79,5, 106, 212, 424, 848 e 1696 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), sem aplicação prévia de inibidor de metabolização.

A aplicação de malathion, inibidor de enzimas P450 não foi eficiente em reverter a resistência ao herbicida imazethapyr (Figura 9; Figura 10). Verificou-se um aumento nos FR com aplicação prévia deste inibidor, sendo 70,76 e 73,80 para as variáveis massa fresca e seca da parte aérea, respectivamente (Tabela 5). Diferente do observado nos resultados deste estudo, a resistência relacionada ao incremento na taxa de detoxificação por enzimas P450 já foi descrita em *Echinochloa* resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS. O uso de inibidor de metabolização fenitrothion antecedendo os herbicidas diminuiu o GR<sub>50</sub> de *E. oryzicola* e *E. crus-galli* resistentes ao azimsulfuron, penoxsulam e bispyribac-sodium (Song *et al.*, 2017). Da mesma forma, a aspersão prévia de malathion, PBO e ABT reverteu a resistência ao imazethapyr em biótipos de *E. crus-galli* (Matzenbacher *et al.*, 2014). Dois destes biótipos apresentaram 8,44 e 9,61 vezes maior expressão do gene *CYP8IA6* 24 horas após aspersão com imazethapyr (Dalazen, 2016). A expressão do gene *CYP8IA6* foi superior mesmo na ausência do herbicida.

A superexpressão de dois genes *CYP8IA12* e *CYP8IA21* foi verificada em plantas de *E. phyllopogon* resistentes ao bensulfuron-methyl e penoxsulam (Iwakami *et al.*, 2014a). Essas plantas metabolizam o herbicida bensulfuron-methyl mais rapidamente através de O-demetilação em relação às suscetíveis. Também em *E. phyllopogon*, a expressão de genes *CYP7IAK2* e *CYP72A254* foi superior após a aplicação de bispyribac-sodium no biótipo resistente (Iwakami *et al.*, 2014b). Foram observados polimorfismos em ambos os genes *CYP* entre biótipos resistentes e suscetíveis, que podem estar relacionados à alteração na atividade catalítica das enzimas, tornando-as mais ativas (Iwakami *et al.*, 2014b).

O genoma das plantas possui centenas de genes codificadores de enzimas P450, sendo que cada um participa de várias rotas bioquímicas para produzir metabólitos primários e secundários (Mizutani & Ohta, 2010). Contudo, apenas uma pequena fração destes genes está envolvida na resistência aos herbicidas (Délye, 2013).



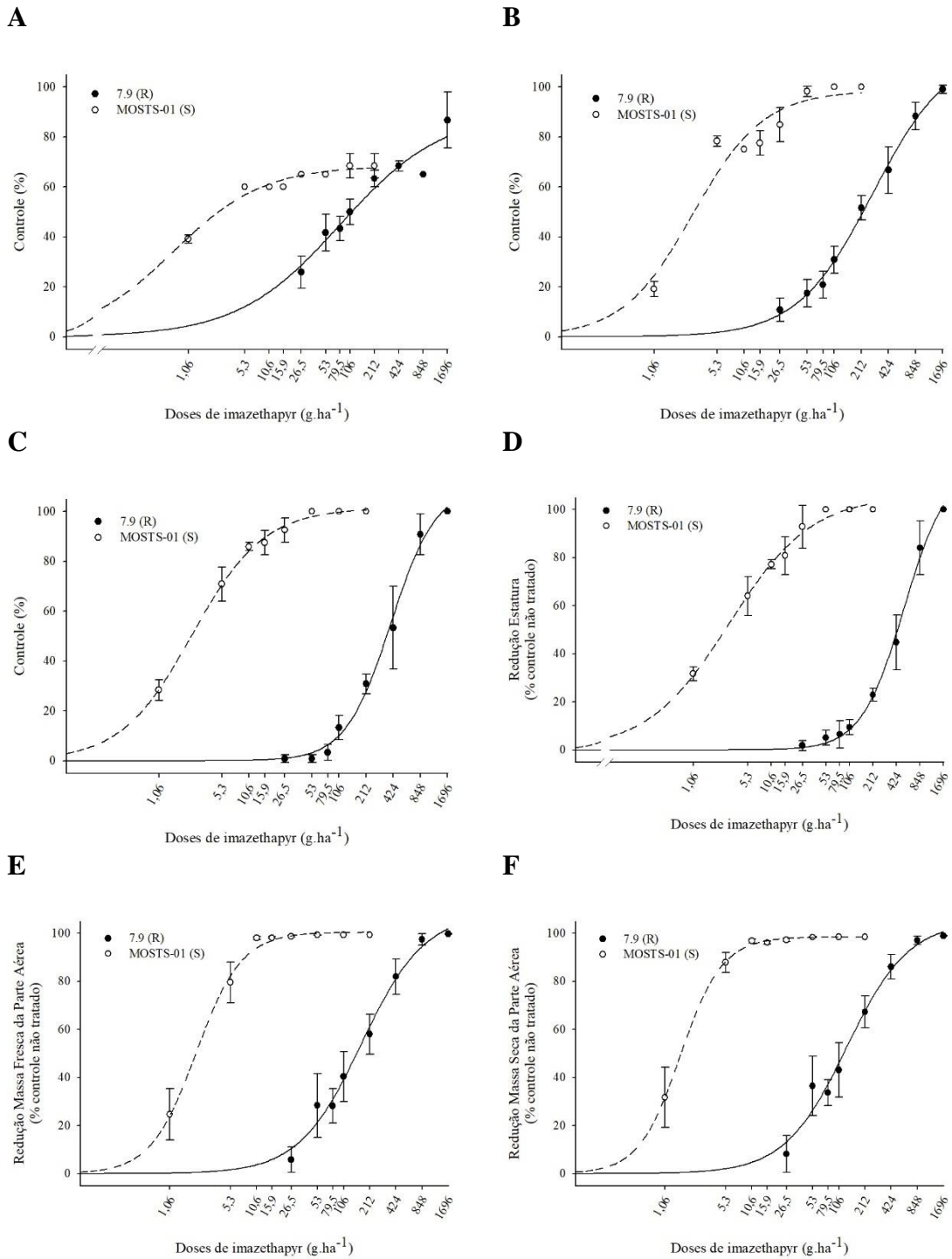


FIGURA 9. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (MOSTS-01) após aplicação de imazethapyr, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 5. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01) após aplicação do herbicida imazethapyr, com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450.

Biótipos	Parâmetros da equação			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>			R <sup>2</sup>	
	a	b	X0	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min		
----- Controle 7 DAT -----								
MOSTS-01 (S)	68,316*	-0,783*	0,692*	2,49	(3,40	1,87)		0,99
7.9 (R)	89,939*	-0,685*	79,815 <sup>ns</sup>	110,76	(113,83	83,67)	44,38	0,95
----- Controle 14 DAT -----								
MOSTS-01 (S)	98,418*	-1,106*	2,858*	2,94	(3,27	2,38)		0,95
7.9 (R)	115,043*	-1,035*	284,870*	220,98	(224,94	211,82)	75,10	0,99
----- Controle 21 DAT -----								
MOSTS-01 (S)	101,289*	-1,095*	2,484*	2,42	(2,50	2,34)		0,99
7.9 (R)	110,134*	-1,723*	398,124*	357,69	(365,89	341,76)	147,34	0,99
----- Estatura -----								
MOSTS-01 (S)	105,675*	-0,823*	3,092*	2,71	(2,77	2,60)		0,99
7.9 (R)	117,648*	-1,587*	528,425*	436,80	(443,05	421,86)	160,93	0,99
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----								
MOSTS-01 (S)	100,384*	-1,658*	2,128*	2,11	(2,21	2,01)		0,99
7.9 (R)	108,335*	-1,198*	170,523*	149,93	(154,18	140,61)	70,76	0,98
----- Massa Seca da Parte Aérea -----								
MOSTS-01 (S)	98,378*	-1,805*	1,601*	1,63	(1,65	1,60)		0,99
7.9 (R)	105,096*	-1,214*	130,357*	120,34	(124,40	111,36)	73,80	0,98

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50% (g.ha<sup>-1</sup>); GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50% (g.ha<sup>-1</sup>); EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

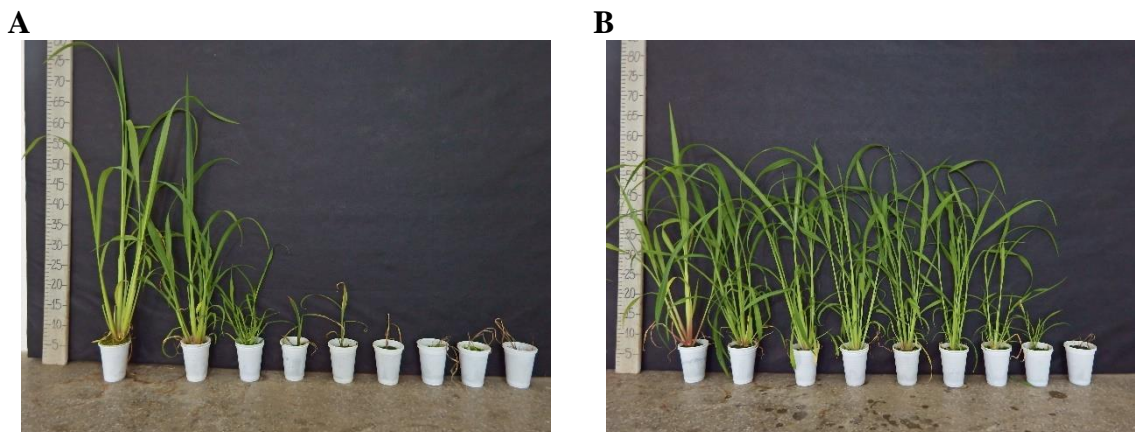


FIGURA 10. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com imazethapyr nas doses de 0, 1,06, 5,3, 10,6, 15,9, 26,5, 53, 106 e 212 g. ha<sup>-1</sup> para a o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 26,5, 53, 79,5, 106, 212, 424, 848 e 1696 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450.

A aplicação do NBD-Cl, inibidor de enzimas GST, também não foi eficiente em reverter a resistência ao herbicida imazethapyr (Figura 11; Tabela 6; Figura 12). No entanto foi observado uma redução nas doses de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  de todas as variáveis avaliadas e, conseqüentemente, houve diminuição no FR em comparação aos observados quando aplicado o herbicida isoladamente, sem inibidor (Tabela 4; Tabela 6). As doses de  $GR_{50}$  das variáveis massa fresca e seca da parte aérea do biótipo resistente sem aplicação de inibidor foram 134,06 e 177,52 g.ha<sup>-1</sup>, e o FR de 47,50 e 45,38, respectivamente. Contudo, após aplicação de NBD-Cl as doses de  $GR_{50}$  foram 119,389 e 97,563 g.ha<sup>-1</sup>, produzindo FR de 42,57 e 42,74. As variáveis de controle visual e estatura reduziram os FR para abaixo de 100 quando aplicado o inibidor de enzimas GST. Isto indica que estas enzimas possuem ação na detoxificação deste herbicida.

Enzimas GST são codificadas por uma grande e diversa família gênica em plantas, as quais diferem em número, especificidade ao herbicida e indutibilidade em diferentes plantas (Labrou *et al.*, 2015). A detoxificação por conjugação com glutathione (GSH) é observada principalmente em herbicidas pertencentes aos grupos químicos das clorotriazinas, difenileters, cloroacetanilidas, sulfoniluréias e ariloxifenoxipropionatos (Cummins *et al.*, 2011). Porém, outros estudos também observaram influência de enzimas GST na resistência às imidazolinonas. Biótipos de *E. crus-galli* resistentes ao imazethapyr apresentaram expressão de 6 a 12 vezes maior do gene *GSTF1* nos biótipos resistentes (Dalazen, 2016).

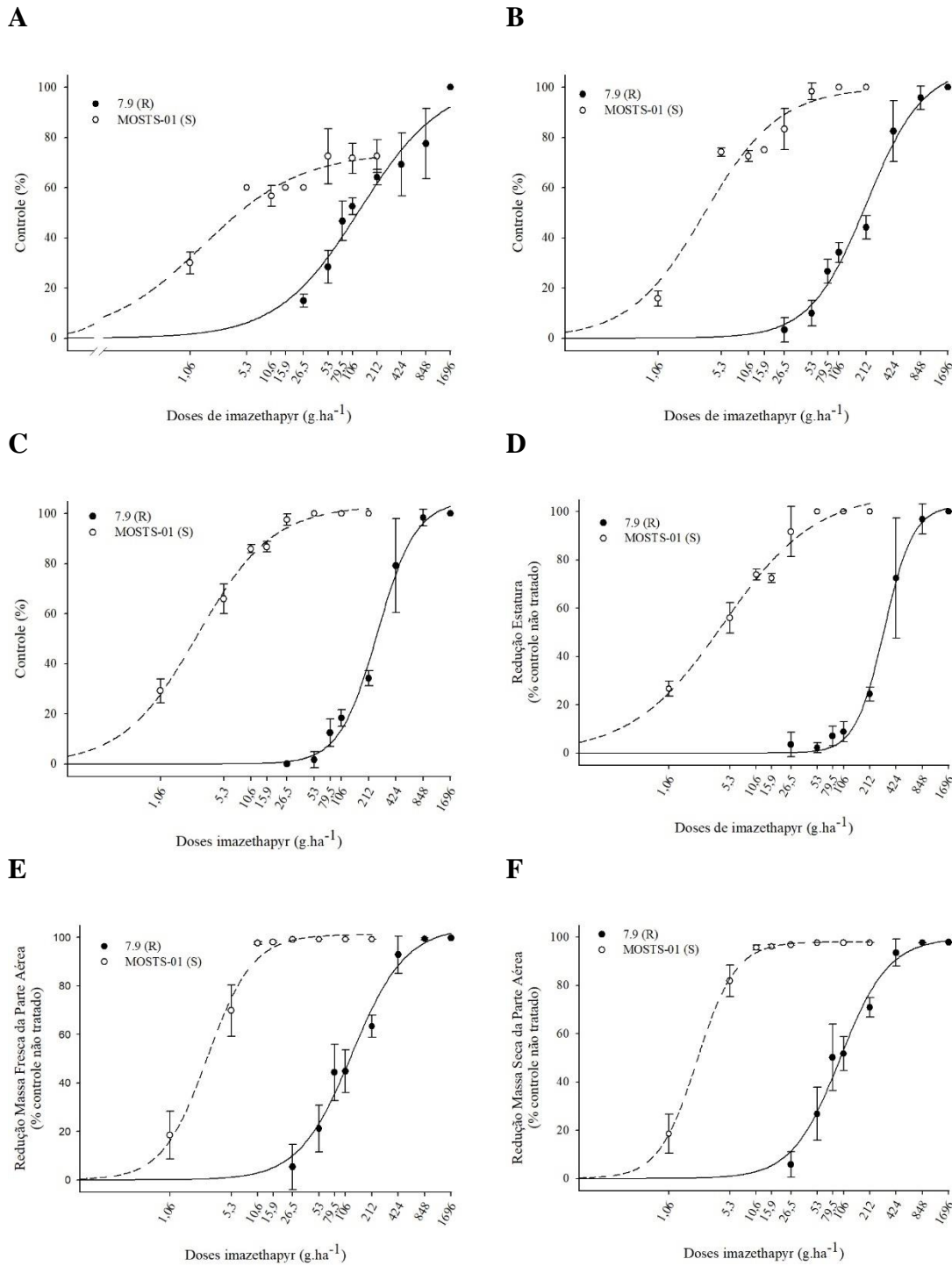


FIGURA 11. Controle visual aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) DAT, redução de estatura (D), massa fresca (E) e massa seca da parte aérea (F) em comparação com o controle não tratado, de biótipos de *Echinochloa crus-galli*, resistente (7.9) e suscetível (MOSTS-01) após aplicação de imazethapyr, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7, 14 e 21 DAT, redução da estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea de um biótipo resistente (7.9) e um suscetível (MOSTS-01) após aplicação do herbicida imazethapyr, com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST.

Biótipos	Parâmetros da equação			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>			R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	X <sub>0</sub>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	
----- Controle 7 DAT -----							
MOSTS-01 (S)	74,008*	-0,724*	1,534*	4,228	(5,78	2,97)	0,96
7.9 (R)	102,516*	-0,854*	130,101*	122,833	(123,24	96,81)	29,05 0,95
----- Controle 14 DAT -----							
MOSTS-01 (S)	99,797*	-1,048*	3,467*	3,481	(3,78	2,84)	0,95
7.9 (R)	108,070*	-1,390*	215,439*	193,458	(200,00	177,50)	55,57 0,98
----- Controle 21 DAT -----							
MOSTS-01 (S)	103,001*	-1,048*	2,720*	2,573	(2,67	2,44)	0,99
7.9 (R)	105,039*	-2,055*	265,817*	253,686	(261,80	241,99)	98,59 0,99
----- Estatura -----							
MOSTS-01 (S)	107,668*	-0,824*	4,515*	3,798	(3,84	3,52)	0,98
7.9 (R)	102,590*	-2,623*	310,520*	304,600	(311,87	295,70)	80,20 0,99
----- Massa Fresca da Parte Aérea -----							
MOSTS-01 (S)	101,100*	-1,682*	2,841*	2,804	(3,00	2,58)	0,99
7.9 (R)	104,142*	-1,428*	126,229*	119,389	(123,85	111,06)	42,57 0,98
----- Massa Seca da Parte Aérea -----							
MOSTS-01 (S)	98,003*	-1,966*	2,235*	2,282	(2,33	2,23)	0,99
7.9 (R)	99,605*	-1,573*	97,072*	97,563	(101,43	91,95)	42,74 0,98

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C<sub>50</sub>: dose necessária para controle de 50% (g.ha<sup>-1</sup>); GR<sub>50</sub>: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50% (g.ha<sup>-1</sup>); EP: erro padrão da média; FR: fator de resistência.

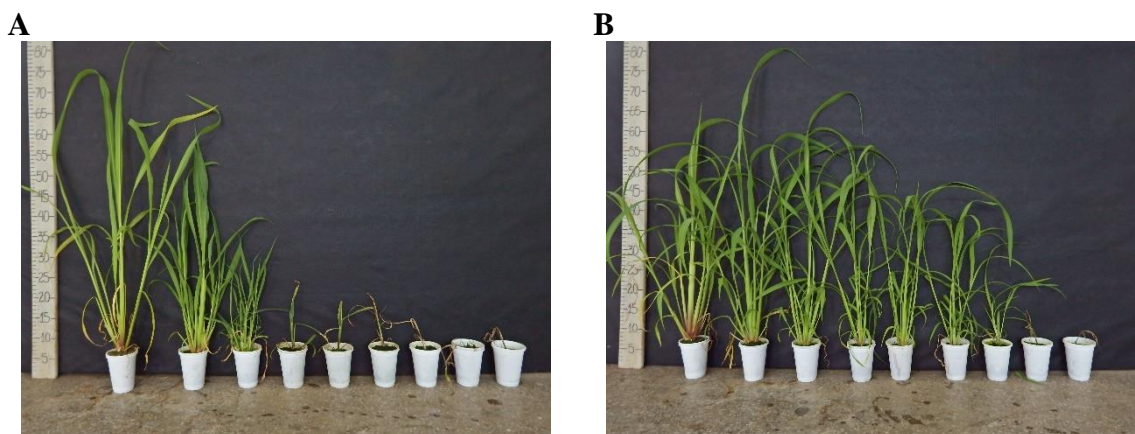


FIGURA 12. Crescimento das plantas de *Echinochloa crus-galli* aos 21 DAT tratados com imazethapyr nas doses de 0, 1,06, 5,3, 10,6, 15,9, 26,5, 53, 106 e 212 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo suscetível (A) e nas doses de 0, 26,5, 53, 79,5, 106, 212, 424, 848 e 1696 g. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente (B), com aplicação prévia de NBD-Cl, inibidor de enzimas GST.

Os resultados sugerem que a resistência do biótipo 7.9 ao herbicida imazethapyr provavelmente não esteja relacionada com incremento na taxa de detoxificação do herbicida via P450. Contudo, as enzimas GSTs devem atuar na detoxificação do herbicida. Há a possibilidade de que os inibidores de metabolização utilizados possam não ter efeito sobre as enzimas responsáveis pela resistência.

O mecanismo relacionado ao local de ação do herbicida também pode estar contribuindo para a resistência no biótipo resistente. Alterações como Trp574Leu e Ser653Asn na sequência codificadora do gene ALS já foram identificadas como responsáveis pela resistência de *E. crus-galli* ao herbicida imazethapyr (Matzenbacher *et al.*, 2014). A mutação Ala122Asn é responsável pela resistência-cruzada de *E. crus-galli* ao nicosulfuron, penoxsulam, bispyribac-sodium e imazamox, herbicidas inibidores da enzima ALS, mas de diferentes grupos químicos (Panozzo *et al.*, 2017). Um mesmo biótipo pode apresentar tanto mecanismo relacionado como não relacionado ao local de ação conferindo resistência a um mesmo herbicida, ambos não são excludentes (Matzenbacher *et al.*, 2014).

A espécie *E. crus-galli* é hexaplóide, resultante de um cruzamento interespecífico entre *E. phyllopogon* (4n) e outra espécie diploide (2n) não identificada do gênero *Echinochloa* (Yabuno, 1966). Esta espécie possui pelo menos duas cópias ativas do gene ALS, oriundas da espécie *E. phyllopogon* (Iwakami *et al.*, 2012). A mutação em apenas um gene ALS pode conferir baixo nível de resistência, por um efeito de diluição de proteínas resistentes em meio às suscetíveis produzidas pelo gene sem mutação. No entanto este efeito de diluição pode ser reduzido se a expressão do alelo resistente for superior aos suscetíveis (Iwakami *et al.*, 2012).

O biótipo 7.9 já foi caracterizado como resistente ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl, devido a um incremento na metabolização em resposta protetor presente na formulação do herbicida (Capítulo 1). No presente estudo foi comprovada a resistência múltipla deste mesmo biótipo também aos herbicidas quinclorac e imazethapyr. A resistência ao herbicida

quinclorac foi de alto nível (FR>100) e com mecanismo não elucidado, mas possivelmente não esteja relacionada à detoxificação do herbicida via enzimas P450 e GST. Uma maior detoxificação do cianeto através da enzima  $\beta$ -CAS possivelmente também não ocorra visto que o malathion também é capaz de inibir esta enzima (Yasuor *et al.*, 2012). Outras enzimas envolvidas na rota do etileno ou receptores de auxinas podem estar relacionadas com a resistência ao quinclorac. A resistência ao imazethapyr não foi revertida, e nem mesmo as doses de GR<sub>50</sub> foram reduzidas, com o uso de inibidor de enzimas P450, como verificado em outros estudos. Contudo, o uso de inibidor de enzimas GST, embora não tenha revertido a resistência, proporcionou redução das doses de C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub> e, conseqüentemente, dos FR das variáveis. Este biótipo já mostrou detoxificar mais o herbicida fenoxaprop-p-ethyl através da resposta de enzimas GST ao protetor isoxadifen-ethyl. Mecanismos não relacionados ao local de ação são mais propensos a afetar múltiplos herbicidas de diferentes grupos químicos e mecanismos de ação (Délye, 2013). Todavia, é possível que o biótipo 7.9 apresente mais de um mecanismo de resistência, e possam ser distintos para um ou mais dos três herbicidas estudados.

A ocorrência de resistência múltipla foi observada em 27% dos biótipos de *Echinochloa* coletados entre 2006 e 2016 no estado do Arkansas (EUA), sendo 0,9% com resistência múltipla a quatro mecanismos de ação, 4,7% a três mecanismos e 22% a dois (Rouse *et al.*, 2017). A resistência múltipla mais abundante observada no período foi propanil + quinclorac, seguido de propanil + inibidores da ALS e quinclorac + propanil + inibidores da ALS (Rouse *et al.*, 2017). A resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima ALS + ACCase também foi identificada em *E. crus-galli* em outros países (Panozzo *et al.*, 2013; Iwakami *et al.*, 2015). A evolução da resistência múltipla de *E. crus-galli* aos herbicidas quinclorac + imazethapyr foi encontrada em 14% das populações amostradas no estado do Rio Grande do Sul na safra 2011/12 (Matzenbacher *et al.*, 2014). No entanto, a descoberta da resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima ALS + quinclorac +

ACCCase no Brasil é recente (Eberhardt *et al.*, 2016). A resistência múltipla a estes três mecanismos de ação implica em manejo mais complexo desta planta daninha, visto que o controle químico deve ser feito com herbicidas que causam fitointoxicação na cultura do arroz ou que apresentam menor eficiência de controle da planta daninha. Herbicidas como propanil, clomazone, pendimethalin e thiobencarb são opções para o controle de capim-arroz resistente. O uso de herbicidas pré-emergentes são uma ferramenta para o manejo da resistência, visto que diminuem a quantidade de plantas que serão expostas à pressão de seleção herbicida em pós-emergência, e uniformizam o estágio das plantas daninhas para a aplicação.

#### **4.4 Conclusão**

O biótipo 7.9 apresentou resistência múltipla aos herbicidas quinclorac e imazethapyr, além de fenoxaprop-p-ethyl já caracterizada em estudos anteriores. O uso de inibidores de enzimas P450 e GSTs não reverteram a resistência quando aplicado o herbicida quinclorac. O mecanismo de resistência não está relacionado ao incremento na detoxificação mediado por estas enzimas. O mecanismo de resistência ao herbicida imazethapyr também não está associado à maior detoxificação por enzimas P450. No entanto as enzimas GST possuem papel na detoxificação deste herbicida, pois o uso de inibidor reduziu o GR<sub>50</sub> das variáveis. A identificação de resistência múltipla a três dos principais mecanismos de ação tradicionalmente utilizados para controle de capim-arroz limita as estratégias para o manejo desta planta daninha através destes herbicidas, e indica a necessidade de utilização de herbicidas de outros mecanismos de ação, principalmente herbicidas pré-emergentes, e de métodos integrados de controle de plantas daninhas na cultura do arroz.



#### 4.5 Referências bibliográficas

- ABDALLAH, I. *et al.* Mechanism of resistance to quinclorac in smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 84, n. 1, p.38-48, 2006.
- BAKKALI, Y. *et al.* Late Watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): Mechanisms Involved in the Resistance to Fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 10, p.4052-4058, 2007.
- CHISM, W.J. *et al.* Uptake, translocation, and metabolism of quinclorac in two grass species. **Weed Technology**, Champaign, v. 5, n. 4, p.771–775, 1991.
- CUMMINS, I. *et al.* Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, London, v. 43, n. 2, p. 266-280, 2011.
- DALAZEN, G. **Avaliação de genes relacionados ao incremento de metabolização e efeito da temperatura e da concentração de CO2 em capim-arroz resistente a imazethapyr**. 2016. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- 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**, Malden, v.69, n.2, p.176-87, 2013.
- EBERHARDT, D.S. *et al.* Barnyardgrass with Multiple Resistance to Synthetic Auxin, ALS and Accase Inhibitors. **Planta Daninha**, Viçosa, v.34, n.4, p.823-832, 2016.
- GAINES, T.A. *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **The Plant Journal**, Oxford, v.78, n.5, p.865-76, 2014.
- GAO, Y. *et al.* Resistance to quinclorac caused by the enhanced ability to detoxify cyanide and its molecular mechanism in *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.143, p.231-238, 2017.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.C. Non-target Site Mechanisms of Resistance to Herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.36, n.1, p.24-34, 2017.
- GROSSMAN, K.; KWIATKOWSKI, J. Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.51, n.2, p.150–160, 1995.
- GROSSMAN, K. A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.97, n.4, p.772–775, 1996.
- GROSSMAN, K; KWIATKOWSKI, J. The mechanism of quinclorac selectivity in grasses. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.66, n.2, p.83–91, 2000.

- HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds.** [2017]. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 11 dez. 2017.
- IWAKAMI, S. *et al.* Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. **Pest Management Science**, Malden, v.68, n.7, p.1098-1106, 2012.
- IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, 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**, Malden, v.70, n. 4, p. 549-558, 2014b.
- IWAKAMI, S. *et al.* Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.119, p.1–8, 2015.
- LABROU, N.E. *et al.* Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.32, p.186–194, 2015.
- 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.
- LOVELACE, M.L. *et al.* Quinclorac Absorption and Translocation Characteristics in Quinclorac- and Propanil-Resistant and -Susceptible Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) Biotypes. **Weed Technology**, Champaign, v.21, n.3, p.683–687, 2007.
- MATZENBACHER *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, London, v.153, n.6, p.1044-1058, 2014.
- MIZUTANI, M.; OHTA, D. Diversification of P450 genes during land plant evolution. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.291–315, 2010.
- PANOZZO, S. *et al.* Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.105, n.2, p. 93-101, 2013.
- PANOZZO, S. *et al.* A New Ala-122-Asn Amino Acid Change Confers Decreased Fitness to ALS-Resistant *Echinochloa crus-galli*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.8, n. 2042, 2017.
- RAHMAN, M.M. *et al.* Study on resistant biotypes of *Echinochloa crus-galli* in Malaysia. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.4, n.2, p.107-115, 2010.
- ROUSE, C.E. *et al.* *Echinochloa* Resistance to Herbicides Continues to Increase in Arkansas Rice Fields. **Weed Technology**, Champaign, v.32, n.1, p.34-44, 2017.

- RUIZ-SANTAELLA, J.P. *et al.* Resistance mechanisms to cyhalofop-butyl in a biotype of *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. from California. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.10, p.95-100, 2006.
- SKIPSEY, M. *et al.* Xenobiotic responsiveness of *Arabidopsis thaliana* to a chemical series derived from a herbicide safener. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.286, n.37, p.32268–32276, 2011.
- SONG, J. *et al.*, Cross-resistance of *Echinochloa* species to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Weed Biology and Management**, Carlton, v.17, n.2, p.91–102, 2017.
- WRIGHT, A.A. *et al.* Characterization of Fenoxaprop-P-Ethyl-Resistant Junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaign, v.64, n.4, p.588-595, 2016.
- XU, W. *et al.* Rice transcriptome analysis to identify possible herbicide quinclorac detoxification genes. **Frontiers in Genetics**, v.6, n. 306, 2015.
- YABUNO, T. Biosystematic study of the genus *Echinochloa*. **Journal of Japanese Botany**, Tokyo, v.19, p.277–323, 1966.
- YASUOR, H. *et al.* Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, Malden, v.68, n.1, p.108–115, 2012.
- YIP, W.K.; YANG, S.F. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n.2, p.473–476, 1988.

## **5 CAPÍTULO 3**

**Resistência cruzada negativa ao clomazone em capim-arroz resistente às  
imidazolinonas causada por incremento de metabolização**

## RESISTÊNCIA CRUZADA NEGATIVA AO CLOMAZONE EM CAPIM-ARROZ RESISTENTE ÀS IMIDAZOLINONAS CAUSADA POR INCREMENTO DE METABOLIZAÇÃO

### RESUMO

Alguns casos de resistência de capim-arroz a herbicidas inibidores da enzima ALS estão relacionados ao incremento de metabolização proporcionada por enzimas P450. Este processo pode alterar o metabolismo de herbicidas que necessitam ser ativados nas plantas. O herbicida clomazone é um pró-herbicida que possui grande utilização na cultura do arroz para controle de capim-arroz resistente a herbicidas. O objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de resistência cruzada negativa ao herbicida clomazone em populações de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes aos inibidores da ALS por incremento na taxa de metabolização. Foram realizadas curvas de dose-resposta com aspersão foliar e aplicação em hidroponia do herbicida clomazone em biótipos suscetíveis e resistentes às imidazolinonas que possuem resistência associada ao mecanismo de incremento de metabolização. A atividade de enzimas antioxidantes nos biótipos aspergidos com 400 g.ha<sup>-1</sup> de clomazone foi avaliada. A participação de metabolização foi avaliada através do malathion, inibidor de P450. A ocorrência de resistência cruzada negativa (RCN) foi observada nos quatro biótipos resistentes quando comparados com dois dos quatro suscetíveis avaliados. Os resultados obtidos com aplicação de clomazone via hidroponia corroboraram com os obtidos via aspersão foliar. A ocorrência e nível de RCN foi dependente da variável avaliada e do biótipo suscetível utilizado para comparação. A aplicação de malathion previamente ao clomazone reverteu a RCN nas duas populações resistentes. Os resultados obtidos indicam que as enzimas P450 que conferem resistência ao herbicida imazethapyr realizam uma maior ativação do clomazone, sendo então estas plantas mais sensíveis. A RCN foi confirmada e está relacionada ao mecanismo que confere resistência às imidazolinonas. A ocorrência de RCN ao herbicida clomazone pode ser uma vantagem desse herbicida em programas de prevenção a evolução de resistência aos herbicidas na cultura do arroz.

## 5.1 Introdução

A grande utilização de cultivares Clearfield®, resistentes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, com mecanismo de ação inibidor da enzima acetolactatosintase (ALS), resultou no predomínio do uso desses herbicidas para o controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em cultivos de arroz devido à eficiência e praticidade (Iwakami *et al.*, 2012). A tecnologia Clearfield® foi desenvolvida com o objetivo de controlar o arroz daninho e outras plantas daninhas na cultura do arroz irrigado (Roso *et al.*, 2010). Porém, o uso contínuo desta tecnologia, sem rotação de herbicidas de outros mecanismos de ação, proporcionou a seleção de biótipos de *Echinochloa crus-galli* resistentes ao grupo das imidazolinonas (Matzenbacher *et al.*, 2014).

A resistência de *E. crus-galli* a herbicidas ALS encontrada em lavouras do Rio Grande do Sul está associada à mutação no gene codificador da enzima alvo, como Trp574Leu, Ser653Asn, Ala122Val e Ala122Thr, e/ou incremento na velocidade de metabolização do herbicida (Matzenbacher *et al.*, 2014; Riar *et al.*, 2013). A ocorrência de resistência não relacionada ao local de ação, causada por incremento de detoxificação, está relacionada à maior expressão de genes codificadores de enzimas não específicas, como glutationa-S-transferase (GST) e citocromo P450 monooxigenase (P450) (Dalazen, 2016). Biótipos de *E. crus-galli* resistentes ao herbicida imazethapyr apresentam até 9,6 e 12,3 vezes mais expressão dos genes *CYP8IA6* e *GSTF1*, respectivamente, em comparação ao biótipo suscetível (Dalazen, 2016). Em *E. phyllopogon* a maior expressão dos genes *CYP8IA12* e *CYP8IA21* está associada à resistência ao penoxsulam e bensulfuron-methyl (Iwakami *et al.*, 2014a), enquanto a maior expressão dos genes *CYP7IAK2* e *CYP72A254* quando aplicado bispyribac-sodium (Iwakami *et al.*, 2014b).

Espécies com aumento da capacidade de detoxificação metabolizam o herbicida rapidamente em compostos não tóxicos, ou menos tóxicos, enquanto espécies suscetíveis são incapazes de fazê-lo, ou o fazem em taxa muito mais lenta (Powles & Yu, 2010). O envolvimento de enzimas P450 na resistência de herbicidas tem sido principalmente identificado em gramíneas, o que pode ser explicado pelo maior número de genes codificadores destas enzimas, em comparação às dicotiledôneas (Powles & Yu, 2010). No entanto, os mecanismos que conferem resistência de plantas daninhas aos herbicidas podem conferir desvantagens às mesmas, como o aumento na sensibilidade a outros herbicidas, sendo neste caso denominado resistência cruzada negativa (RCN) (Délye et al, 2013).

A evolução da resistência em populações de plantas daninhas exige que sejam utilizados herbicidas com mecanismo de ação alternativo, como o clomazone que é um herbicida pré e pós-emergente. A evolução da resistência a este herbicida é verificada em casos isolados de *E. phyllopogon* (Heap, 2017). O herbicida clomazone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-isoxazolidin-3-one] inibe a enzima deoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS) na primeira etapa da via não-mevalonato de síntese de isoprenoides no cloroplasto, impedindo a síntese de pigmentos, como os carotenoides (Ferhatoglu & Barrett, 2006). Quando carotenoides estão ausentes e as plantas são expostas à luz, oxigênio *singlet* e clorofilas *triplet* degradam a clorofila e iniciam a peroxidação de lipídios (Hess, 2000). O clomazone é considerado um pró-herbicida, pois necessita de ativação enzimática para ter ação herbicida. Esta bioativação é realizada por enzimas P450 (Ferhatoglu et al., 2005). As enzimas P450 de plantas representam uma grande e diversificada superfamília gênica, com especificidade de substratos variados (Werck-Reichhart et al., 2000). Primeiramente, o clomazone é convertido em 5-OH-clomazone, e na sequência em 5-ketoclomazone, que é o composto herbicidamente ativo (Ferhatoglu & Barrett, 2006).

No Brasil foi descrita a resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da enzima ALS com mecanismo de resistência associado ao incremento na capacidade de

metabolização dos herbicidas (Matzenbacher *et al.*, 2014). Porém, a informação relacionada à ocorrência de resistência cruzada negativa a clomazone nestes biótipos não é conhecida. É possível que este fenômeno seja confirmado, devido ao clomazone necessitar ser metabolizado para ser ativo na planta, ou seja, plantas com maior capacidade de metabolização tornam o herbicida clomazone mais ativo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de resistência cruzada negativa ao herbicida clomazone em populações de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes a inibidores de ALS por incremento na taxa de metabolização.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Aplicação do herbicida clomazone via foliar

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação climatizada, temperatura  $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ , fotoperíodo 14/10 horas (dia/noite), na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de julho a outubro de 2017. O arranjo experimental foi bi-fatorial 9X8, em delineamento completamente casualizado. O fator A correspondeu aos biótipos de capim-arroz, quatro biótipos que apresentam resistência ao imazethapyr (ARRGR-01 (Arroio Grande-RS), PALMS-02 (Palmares do Sul-RS), RIOGR-01(Rio Grande-RS) e BAGÉ-01 (Bagé-RS)) e quatro suscetíveis (IRGA-02 (Cachoeirinha-RS), IRGA-03 (Cachoeirinha-RS), MOSTS-01 (Mostardas-RS) e CAPL-01 (Capão do Leão-RS)). O Fator B correspondeu as doses do herbicida clomazone (Gamit EC 500 g L<sup>-1</sup>) (0, 50, 100, 200, 300, 400, 800 e 1600 g ha<sup>-1</sup>). O mecanismo de resistência destes biótipos ao imazethapyr foi caracterizado em estudos anteriores, e classificou a resistência como sendo por incremento na taxa de metabolização do herbicida, via enzimas P450 (Matzenbacher *et al.*, 2014; Dalazen, 2016). Cada tratamento foi composto por seis repetições. O experimento foi repetido uma vez.



As sementes foram germinadas por imersão na solução de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$  0,2%) a 25 °C por cinco dias. Após, foram transplantadas em vasos plásticos, com volume de 200 mL. Cada vaso foi perfurado e preenchido com uma mistura de solo e composto orgânico, com complementação de adubação com NPK. A aplicação do herbicida clomazone foi realizada em plantas em estágio de 3-4 folhas com câmara de aspersão automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), ponta de pulverização TJ8002E, volume de calda foi de 200 L ha<sup>-1</sup>. As plantas foram mantidas com irrigação por submersão durante todo o período após o transplante.

A avaliação de controle foi realizada aos 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se uma escala percentual visual, na qual 0% corresponde ausência de injúrias, e 100% significa morte da planta. Aos 19 DAT foi realizada a avaliação do índice de clorofila total, com o auxílio do equipamento clorofiLOG (Falker). O índice de clorofila foi mensurado no centro da última folha completamente expandida de cada planta. Foram realizadas medições em três plantas de cada tratamento, e cinco medições em cada planta. Aos 21 DAT foi mensurada a estatura de plantas e realizada a coleta da massa fresca da parte aérea (MFPA). Após a coleta as amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada em temperatura de 60 °C por sete dias para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram ajustados pelo modelo de regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y = a / (1 + (x/x_0)^b)$ . Os dados de controle visual foram transformados  $(\sqrt{x} + 1)$  para atenderem aos requisitos da ANOVA. Para a determinação dos valores de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$ , o y da equação foi substituído por 50 (50% de controle).  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  representam a dose necessária para atingir 50% de controle e 50% de redução de crescimento, respectivamente.

### 5.2.2 Aplicação do herbicida clomazone via hidroponia

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação climatizada, temperatura 25 °C  $\pm$  3 °C, fotoperíodo 14/10 horas (dia/noite), na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de julho a outubro de 2017. O arranjo experimental foi bi-fatorial 4X8, em delineamento completamente casualizado. O fator A consistiu de biótipos de capim-arroz, sendo dois com resistência ao imazethapyr (RIOGR-01 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01). O fator B foi composto por doses do herbicida clomazone (Gamit EC 500 g L<sup>-1</sup>) (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu$ M). Cada tratamento foi composto por quatro repetições.

As sementes foram germinadas por imersão na solução de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub> 0,2%) a 25°C por cinco dias. Quando houve a emissão da primeira folha, foram transferidas para vasos plásticos, com volume de 200 mL. Cada vaso recebeu uma planta, fixada em estrutura de poliestireno, e capacidade de 160 mL de solução nutritiva. A solução nutritiva (Matzenbacher, 2012 - Tabela 1) foi substituída a cada quatro dias, sendo preparada no dia, e seu pH ajustado para 5,5 com adição de NaOH. O herbicida clomazone foi aplicado na solução hidropônica quando as plantas atingiram três folhas expandidas. A solução de cada tratamento permaneceu com o herbicida por 24 horas, e após foi substituída pela solução nutritiva sem herbicida.

A avaliação de controle foi realizada aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT). Aos 10 DAT foi realizada a avaliação do índice de clorofila total, e aos 14 DAT foi mensurada a estatura de plantas e realizada a avaliação de massa fresca da parte aérea (MFPA). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada, 60 °C por sete dias, e após foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram ajustados pelo modelo de regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y = a / 1 + (x/x_0)^b$ . Os dados de controle visual foram transformados ( $\sqrt{x+1}$ ) para atenderem os requisitos da ANOVA. Para

a determinação dos valores de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$ , o  $y$  da equação foi substituído por 50 (50% de controle).

TABELA 1. Composição da solução nutritiva utilizada para o cultivo de capim-arroz em hidroponia (Matzenbacher, 2012).

Nutriente	Composto	Concentração final
Potássio	KCl	0,1 mM
Potássio, Fósforo	$KH_2PO_4$	0,1 mM
Potássio, Enxofre	$K_2SO_4$	0,7 mM
Cálcio, Nitrogênio	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$	2 mM
Magnésio	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 mM
Manganês	$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,5 $\mu M$
Molibdênio	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	0,01 $\mu M$
Boro	$H_3BO_3$	10 $\mu M$
Zinco	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 $\mu M$
Cobre	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,2 $\mu M$
Ferro	$Fe_2(SO_4)_3 \cdot X H_2O$	100 $\mu M$
Quelante	EDTA dissódico	100 $\mu M$

### 5.2.3 Aplicação do herbicida clomazone + inibidor de metabolização

O experimento foi conduzido nas mesmas condições descritas no item 5.2.1. O arranjo experimental foi tri-fatorial  $3 \times 8 \times 2$ , em delineamento completamente casualizado. O fator A correspondeu aos biótipos de capim-arroz, sendo dois com resistência ao imazethapyr (ARRGR-01 e RIOGR-01) e um suscetível (IRGA-02). O fator B foi composto pelas doses do herbicida clomazone (Gamit EC 500 g L<sup>-1</sup>) (0, 50, 100, 200, 300, 400, 800 e 1600 g.ha<sup>-1</sup>). O Fator C constituiu da presença ou ausência do malathion, inibidor de metabolização via enzimas P450. Cada tratamento foi composto por seis repetições. O malathion foi aplicado na dose de 1000 g.ha<sup>-1</sup>, volume de calda de 200 L.ha<sup>-1</sup>, duas horas antes da aplicação do herbicida clomazone. As condições de germinação, condução das plantas e aplicação do herbicida seguem conforme descrito anteriormente.

As avaliações de controle visual, índice de clorofila, estatura de planta, massa fresca e seca foram realizadas conforme descrito previamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram ajustados pelo modelo de

regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y=a/1+(x/x_0)^b$ . Os dados de controle visual foram transformados  $(\sqrt{x}+1)$  para atenderem os requisitos da ANOVA. Para a determinação dos valores de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$ , o  $y$  da equação foi substituído por 50 (50% de controle).

#### 5.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes

As plantas foram germinadas, transplantadas e cultivadas de acordo com o descrito anteriormente. Para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes foi aplicado o herbicida clomazone na dose de  $400 \text{ g ha}^{-1}$ , com volume de calda de  $200 \text{ L ha}^{-1}$ , em seis biótipos de capim-arroz, sendo quatro resistentes ao imazethapyr (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01). A aplicação ocorreu quando as plantas atingiram estágio de três folhas. Procedeu-se a coleta do material vegetal 24 horas após a aplicação (HAA), sendo coletadas três plantas tratadas e três plantas controle de cada biótipo. Coletou-se toda a parte aérea das plantas, aproximadamente 100 mg, e as amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e após armazenadas em ultra freezer ( $-80^\circ\text{C}$ ).

##### 5.2.4.1 Extração das enzimas

As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com tampão de extração: 375 uL de tampão fosfato de potássio pH 7,8 (200 mM); 7,5 uL EDTA dissódico (10 mM); 75 uL de ácido ascórbico (200 mM); 292,5 uL de água; 0,006 g de PVPP em cada amostra. Procedeu-se uma centrifugação a  $12000 \text{ g}$  por 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . Retirou-se o sobrenadante, e procedeu-se uma nova centrifugação, nas mesmas condições, por 10 minutos, por haver ainda resíduos vegetais suspensos. A padronização da quantidade de enzimas foi realizada através do método de Bradford (1976) para quantificação de proteínas, usando albumina de soro bovino como padrão.

#### 5.2.4.2 Atividade da catalase (CAT)

O tampão de reação utilizado para a atividade da enzima catalase (CAT) foi composto por: 500 uL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (200 mM); 400 uL de água; 50 uL de peróxido de hidrogênio (250 mM) e 50 uL de extrato vegetal em cada amostra. O peróxido de hidrogênio foi adicionado no momento da leitura. Para o branco foi substituído o extrato vegetal por água. As leituras foram realizadas a cada 10 segundos, durante dois minutos, no comprimento de onda de 240 nm. Um decréscimo nos valores da absorbância com o passar do tempo foi observado. Para cada repetição biológica foram feitas três replicatas técnicas.

#### 5.2.4.3 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

O tampão de reação utilizado para a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi composto por: 500 uL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (200 mM); 50 uL de ácido ascórbico (10 mM); 350 uL de água; 50 uL de peróxido de hidrogênio (2 mM) e 50 uL de extrato vegetal, em cada amostra. O peróxido de hidrogênio foi adicionado no momento da leitura. Para o branco foi substituído o extrato vegetal por água. As leituras foram realizadas a cada 10 segundos, durante dois minutos, no comprimento de onda de 290 nm. Um decréscimo nos valores da absorbância com o passar do tempo foi observado. Para cada repetição biológica foram feitas três replicatas técnicas.

#### 5.2.4.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O tampão de reação utilizado para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi composto por: 500 uL de tampão fosfato de potássio pH 7,8 (100 mM); 200 uL de metionina (70 mM); 10 uL de EDTA (10 uM); 195 uL de água; 75 uL de NBT (1 mM); 10 uL de riboflavina (0,2 mM) e 10 uL de extrato vegetal, em cada amostra. As amostras foram expostas a luz branca durante 10 minutos. Na amostra controle (branco) foi substituído

o extrato vegetal por água, e foi exposta a luz branca por 10 minutos. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizada uma amostra na qual foi substituído o extrato vegetal por água, e este foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 560 nm. Para cada repetição biológica foram feitas três replicatas técnicas. Uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir 50% da fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

#### 5.2.4.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio

A extração para quantificação do peróxido de hidrogênio foi diferente da realizada para atividade enzimática. 100 mg de tecido vegetal foi macerada em nitrogênio líquido e imediatamente após foi homogeneizado com 1,4 mL de TCA (0,1%). Foi realizada uma centrifugação a 12000 g, por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e foi realizada uma nova centrifugação por 10 min, para separação das impurezas que ainda estavam em suspensão.

O tampão de reação foi composto por: 250 uL de tampão de potássio pH 7,0 (10mM), 500 uL de iodeto de potássio (1M) e 250 uL de extrato vegetal em cada amostra. Para o branco substituiu-se o volume do extrato vegetal pelo tampão de reação. Procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 390 nm.

Os dados da atividade de enzimas do estresse oxidativo e quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Havendo significância ( $p \leq 0,05$ ) foram submetidos ao teste de tukey 5%.

### 5.3 Resultados e discussão

### 5.3.1 Aplicação do herbicida clomazone via foliar e hidroponia

Os dados de controle visual aos 14 e 21 dias após o tratamento (DAT), índice de clorofila total, estatura de plantas, massa fresca e massa seca da parte aérea com aplicação de clomazone via aspersão foliar apresentaram interação significativa entre biótipos e doses de clomazone segundo a ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Aos 14 DAT o biótipo IRGA-03, suscetível às imidazolinonas, apresentou a maior dose de  $C_{50}$  entre todos os biótipos avaliados (Figura 1; Tabela 2; Figura 2). O biótipo ARRGR-01, resistente aos herbicidas ALS, apresenta resistência cruzada negativa (RCN) quando comparado a todos os biótipos suscetíveis, enquanto PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01 apresentam RCN na comparação com IRGA-02 e IRGA-03 e CAPL-01 (Tabela 3). A avaliação de controle visual aos 21 DAT apresenta todos os biótipos resistentes às imidazolinonas com  $C_{50}$  inferior a todos os suscetíveis avaliados (Tabela 2). As injúrias do herbicida clomazone foram similares entre os biótipos nos primeiros dias após o tratamento, contudo os mais tolerantes apresentam recuperação com o passar dos dias, e os menos tolerantes são incapazes de fazê-lo, ou o fazem de forma mais lenta. Isso pode estar relacionado à variação de resposta existente entre as avaliações visuais dos 14 e 21 DAT (Tabela 3).

A avaliação do índice de clorofila total realizada aos 19 DAT apresenta o biótipo IRGA-03 com a maior dose necessária para redução de 50% do total de clorofila (Tabela 2). Todos os biótipo resistente às imidazolinonas não diferiram significativamente a dose necessária para redução de 50% do total de clorofila na comparação com IRGA-02 e MOSTS-01 (Tabela 2). Pelo fato do clomazone ser um herbicida que atua inibindo a rota de síntese de carotenoides, resultando em plantas com branqueamento nas folhas jovens devido à foto-oxidação da clorofila, a avaliação do índice total de clorofila pode complementar a avaliação visual, sendo que plantas com maiores níveis de injúrias possuem menores quantidades de clorofila total. Em concordância com isso, o herbicida clomazone reduziu a quantidade de clorofilas e carotenoides em folhas de algodão após a aplicação de clomazone

(Ferhatoglu *et al.*, 2005). Foi observada diferença de resultados entre a avaliação visual e o índice clorofila total para alguns biótipos. Isso pode estar atrelado às plantas apresentarem o sintoma de branqueamento, no entanto sem reduzirem o crescimento.

A estatura de plantas apresentou RCN em todos os biótipos resistentes na comparação com IRGA-03, corroborando com as variáveis controle visual e clorofila (Tabela 2; Tabela 3). ARRGR-01 e PALMS-02 apresentaram GR<sub>50</sub> inferiores na comparação com todos os suscetíveis (Tabela 2). A variável massa fresca da parte aérea indica que todos os biótipos resistentes às imidazolinonas apresentam RCN a clomazone na comparação com IRGA-02, IRGA-03 e MOSTS-01 (Tabela 3). A avaliação de massa seca apresenta todos os biótipos resistentes com RCN quando comparados aos suscetíveis IRGA-02 e IRGA-03, enquanto ARRGR-01 e BAGÉ-01 apresentaram RCN também na comparação com MOSTS-01 e CAPL-01 (Tabela 3). Os biótipos suscetíveis MOSTS-01 e CAPL-01 podem possuir um aparato enzimático capaz de ativar mais o herbicida clomazone, mas incapaz de conferir resistência a outros herbicidas, como às imidazolinonas.

A ocorrência de RCN exige a avaliação de diversos biótipos resistentes, que apresentem mesmo mecanismo de resistência, comparados com diversos biótipos suscetíveis para que se elimine a possibilidade da casualidade na ocorrência do fenômeno. A constatação de RCN com uma simples comparação de um biótipo resistente com um suscetível é inadequada pois isso pode estar atrelado à uma diferença de suscetibilidade natural, e não atribuída a uma penalidade do mecanismo de resistência. Outros estudos avaliaram a ocorrência de RCN ao mesotrione e pyrasulfotole, inibidores da HPPD, e carfentrazone, inibidor da PPO, em dois biótipos de *Kochia scoparia* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, com mecanismo atribuído à diferentes mutações no local de ação (Beckie *et al.*, 2012). O biótipo com a mutação Trp574 apresentou a ocorrência do fenômeno RCN quando comparado com uma população suscetível, enquanto para o biótipo com a mutação Pro197 não foi verificado. Os autores atribuem este fenômeno a um efeito pleiotrópico associado à



mutação Trp574. No entanto, o fato da comparação ser limitada a poucos biótipos não elimina que seja efeito de variação natural.

Foram calculados os fatores de resistência (FR) para cada variável avaliada, utilizando seus respectivos  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  (Tabela 3). Fatores de resistência inferiores a um ( $<1$ ) significam que o biótipo suscetível às imidazolinonas apresenta doses de  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  superiores ao resistente, ou seja, apresentam RCN. De forma geral, todos os biótipos resistentes apresentaram RCN na comparação com o biótipo IRGA-03. Entre os resistentes, o biótipo ARRGR-01 apresentou  $FR < 1$  estatisticamente significativo na comparação com todos os biótipos suscetíveis em todas as variáveis avaliadas, à exceção ao IRGA-02 e MOSTS-01 quando avaliado o índice de clorofila total. Para casos de avaliação de RCN a análise da significância do  $GR_{50}$  e do fator de resistência (FR) são especialmente importantes.

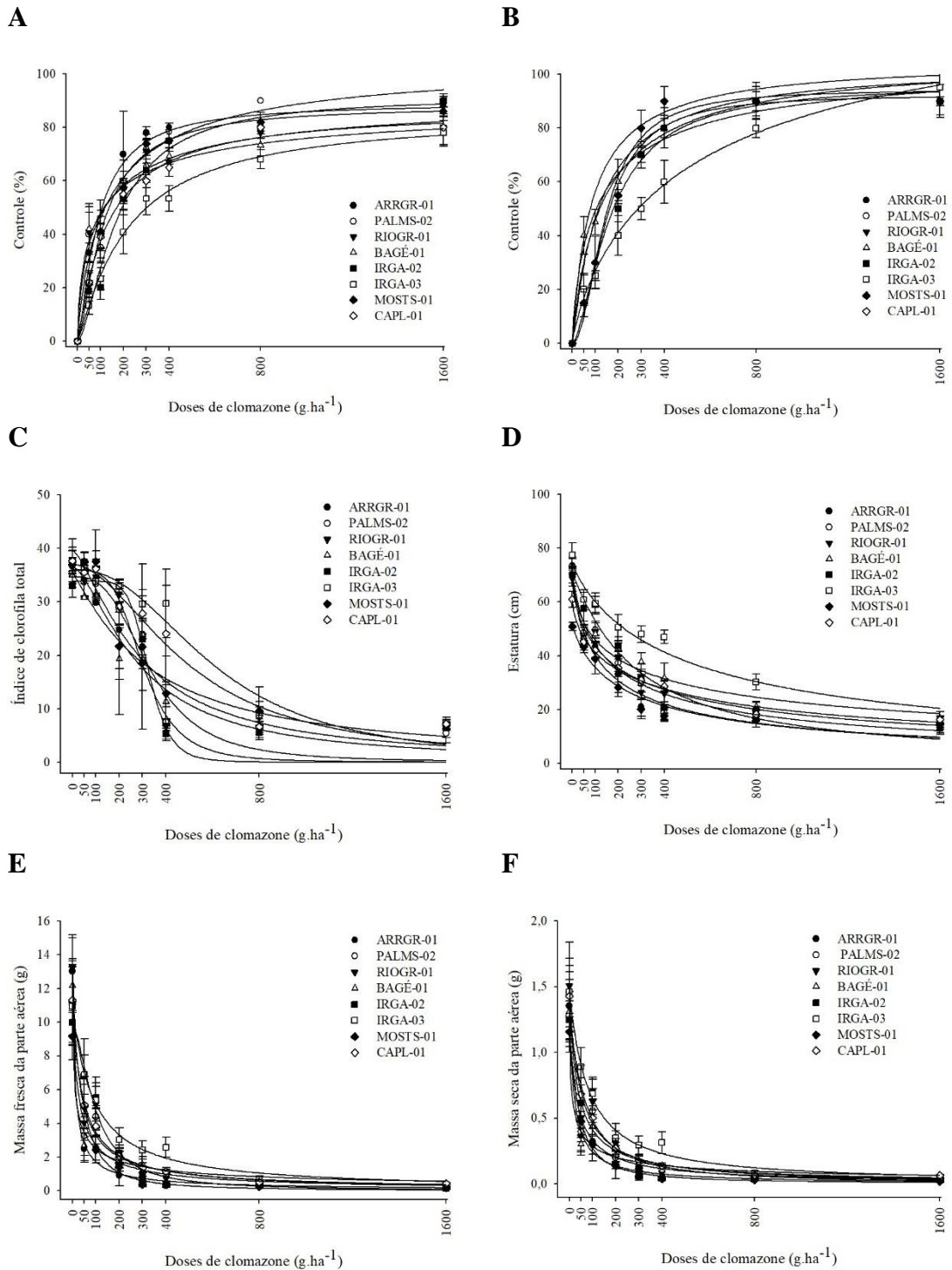


FIGURA 1. Controle visual 14 DAT (A), controle visual 21 DAT (B), índice de clorofila total (C), estatura de planta (D), massa fresca da parte aérea (E), massa seca da parte aérea (F) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e quatro suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, aspergidos com clomazone. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e quatro suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via aspersão foliar.

Biótipo	Parâmetros equação logística				EP GR <sub>50</sub> ou C <sub>50</sub>		R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X0</i>	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	
----- Controle visual (%) 14DAT -----							
ARRGR-01	88,911*	-1,345*	88,158*	106,213	(112,08	98,95)	0,92
PALMS-02	105,946*	-0,840*	137,672 <sup>ns</sup>	120,434	(133,76	91,57)	0,95
RIOGR-01	93,318*	-0,712*	97,415 <sup>ns</sup>	119,159	(152,56	82,58)	0,95
BAGÉ-01	91,508*	-0,644*	86,240 <sup>ns</sup>	115,142	(147,42	83,60)	0,97
IRGA-02	90,287*	-1,672*	171,930*	195,637	(201,36	188,98)	0,96
IRGA-03	85,027*	-1,137*	220,389*	301,392	(312,44	284,46)	0,94
MOSTS-01	87,807*	-1,425*	111,882*	136,129	(141,64	129,66)	0,95
CAPL-01	87,100*	-1,070*	129,713*	171,435	(176,01	165,59)	0,98
----- Controle visual (%) 21 DAT -----							
ARRGR-01	105,513*	-0,964*	86,697*	77,79	(85,77	67,63)	0,95
PALMS-02	103,286*	-1,060*	121,004*	113,96	(120,25	103,37)	0,97
RIOGR-01	106,861*	-0,922*	137,265*	119,40	(127,44	110,91)	0,98
BAGÉ-01	106,902*	-0,759*	123,214*	103,91	(112,88	89,91)	0,98
IRGA-02	96,193*	-1,562*	170,145*	178,99	(186,07	167,15)	0,97
IRGA-03	138,152*	-0,807*	577,184*	286,06	(309,75	260,67)	0,97
MOSTS-01	94,279*	-1,997*	144,858*	153,94	(162,02	143,49)	0,99
CAPL-01	92,332*	-1,950*	148,870*	162,14	(167,89	155,51)	0,99
----- Índice de clorofila total -----							
ARRGR-01	36,707*	1,556*	276,428*	276,25	(333,95	215,32)	0,87
PALMS-02	34,689*	2,994*	333,711*	329,52	(359,94	295,62)	0,9
RIOGR-01	37,557*	1,883*	320,444*	318,38	(372,82	259,19)	0,86
BAGÉ-01	35,261*	1,151*	343,322*	347,32	(456,39	236,77)	0,81
IRGA-02	33,627*	8,554*	333,969*	335,40	(349,54	319,89)	0,9
IRGA-03	36,051*	2,368*	609,813*	593,45	(663,76	519,22)	0,89
MOSTS-01	39,600*	1,439*	287,487*	314,78	(389,10	236,06)	0,82
CAPL-01	36,963*	1,909*	491,332*	481,72	(559,64	398,74)	0,86
----- Estatura de plantas (cm) -----							
ARRGR-01	69,976*	0,758*	144,848*	146,55	(178,49	115,83)	0,91
PALMS-02	73,268*	0,734*	174,143*	173,19	(209,77	138,05)	0,92
RIOGR-01	68,359*	0,708*	229,89*	226,21	(278,81	175,98)	0,89
BAGÉ-01	72,638*	0,584*	253,611*	244,48	(303,39	189,00)	0,91
IRGA-02	70,352*	1,092*	276,425*	278,38	(321,37	235,41)	0,91
IRGA-03	75,199*	0,817*	515,979*	478,78	(567,93	391,62)	0,9
MOSTS-01	52,138*	0,801*	260,07*	275,95	(336,99	216,51)	0,87
CAPL-01	60,715*	0,665*	307,244*	302,96	(350,80	256,64)	0,94

Continua

continuação TABELA 2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e quatro suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via aspersão foliar.

----- Massa fresca da parte aérea (g) -----							
ARRGR-01	13,036*	0,873*	11,593*	11,59	(17,59	5,96)	0,94
PALMS-02	11,184*	0,862*	25,723*	25,58	(38,75	13,45)	0,85
RIOGR-01	13,216*	0,864*	28,417*	28,20	(39,75	17,36)	0,87
BAGÉ-01	12,153*	0,604*	10,335 <sup>ns</sup>	10,31	(17,32	4,17)	0,92
IRGA-02	9,807*	1,689*	97,446*	95,26	(110,49	79,60)	0,9
IRGA-03	10,926*	1,021*	89,423*	88,95	(110,98	67,38)	0,86
MOSTS-01	9,170*	1,558*	55,132*	55,18	(62,57	47,60)	0,93
CAPL-01	11,297*	0,977*	45,601*	45,47	(58,44	32,86)	0,89
----- Massa seca da parte aérea (g) -----							
ARRGR-01	1,353*	0,952*	20,132*	20,10	(29,54	11,21)	0,89
PALMS-02	1,273*	0,838*	25,880*	25,75	(39,60	13,09)	0,85
RIOGR-01	1,500*	0,866*	30,433*	30,29	(41,12	20,03)	0,89
BAGÉ-01	1,310*	0,662*	15,639*	15,65	(23,32	8,68)	0,98
IRGA-02	1,226*	1,253*	72,178*	70,39	(85,57	55,16)	0,88
IRGA-03	1,456*	1,047*	81,012*	80,88	(103,97	58,26)	0,83
MOSTS-01	1,156*	1,262*	39,257*	39,26	(46,83	31,66)	0,92
CAPL-01	1,427*	1,022*	48,961*	48,90	(61,31	36,74)	0,89

\*parâmetro estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup>parâmetro não significativo estatisticamente;  $C_{50}$  = dose de clomazone necessária para controle de 50% ( $\text{g} \cdot \text{ha}^{-1}$ );  $GR_{50}$  = dose de clomazone necessária para redução de 50% do crescimento ( $\text{g} \cdot \text{ha}^{-1}$ ); EP = erro padrão da média.

TABELA 3. Fatores de resistência para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura e massa fresca e seca da parte aérea, através do cálculo  $FR = GR_{50} \text{ Resistente} / GR_{50} \text{ Suscetível}$ , comparando biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, BAGÉ-01 e RIOGR-01) e suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via aspersão foliar.

Fatores de resistência (FR)				
-----Controle visual 14 DAT -----				
	IRGA-02	IRGA-03	MOSTS-01	CAPL-01
ARRGR-01	0,54*	0,35*	0,78*	0,62*
PALMS-02	0,61*	0,40*	0,88 <sup>ns</sup>	0,70*
RIOGR-01	0,61*	0,39*	0,87 <sup>ns</sup>	0,69*
BAGÉ-01	0,59*	0,38*	0,84 <sup>ns</sup>	0,67*
-----Controle visual 21 DAT -----				
	IRGA-02	IRGA-03	MOSTS-01	CAPL-01
ARRGR-01	0,43*	0,27*	0,50*	0,48*
PALMS-02	0,64*	0,40*	0,74*	0,70*
RIOGR-01	0,67*	0,42*	0,77*	0,74*
BAGÉ-01	0,58*	0,36*	0,67*	0,64*
----- Índice de clorofila total -----				
	IRGA-02	IRGA-03	MOSTS-01	CAPL-01
ARRGR-01	0,82 <sup>ns</sup>	0,46*	0,88 <sup>ns</sup>	0,57*
PALMS-02	0,98 <sup>ns</sup>	0,55*	1,05 <sup>ns</sup>	0,68*
RIOGR-01	0,95 <sup>ns</sup>	0,53*	1,01 <sup>ns</sup>	0,66*
BAGÉ-01	1,03 <sup>ns</sup>	0,58*	1,10 <sup>ns</sup>	0,72 <sup>ns</sup>
----- Estatura de plantas -----				
	IRGA-02	IRGA-03	MOSTS-01	CAPL-01
ARRGR-01	0,53*	0,31*	0,53*	0,48*
PALMS-02	0,62*	0,36*	0,63*	0,57*
RIOGR-01	0,81 <sup>ns</sup>	0,47*	0,82 <sup>ns</sup>	0,75 <sup>ns</sup>
BAGÉ-01	0,88 <sup>ns</sup>	0,51*	0,88 <sup>ns</sup>	0,81 <sup>ns</sup>
----- Massa fresca da parte aérea -----				
	IRGA-02	IRGA-03	MOSTS-01	CAPL-01
ARRGR-01	0,12*	0,13*	0,21*	0,25*
PALMS-02	0,26*	0,28*	0,46*	0,56 <sup>ns</sup>
RIOGR-01	0,29*	0,31*	0,51*	0,62 <sup>ns</sup>
BAGÉ-01	0,11*	0,11*	0,19*	0,22*
----- Massa seca da parte aérea -----				
	IRGA-02	IRGA-03	MOSTS-01	CAPL-01
ARRGR-01	0,28*	0,25*	0,51*	0,41*
PALMS-02	0,36*	0,32*	0,65 <sup>ns</sup>	0,53 <sup>ns</sup>
RIOGR-01	0,43*	0,37*	0,77 <sup>ns</sup>	0,62 <sup>ns</sup>
BAGÉ-01	0,22*	0,19*	0,40*	0,32*

\*FR estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup>FR não significativo estatisticamente.

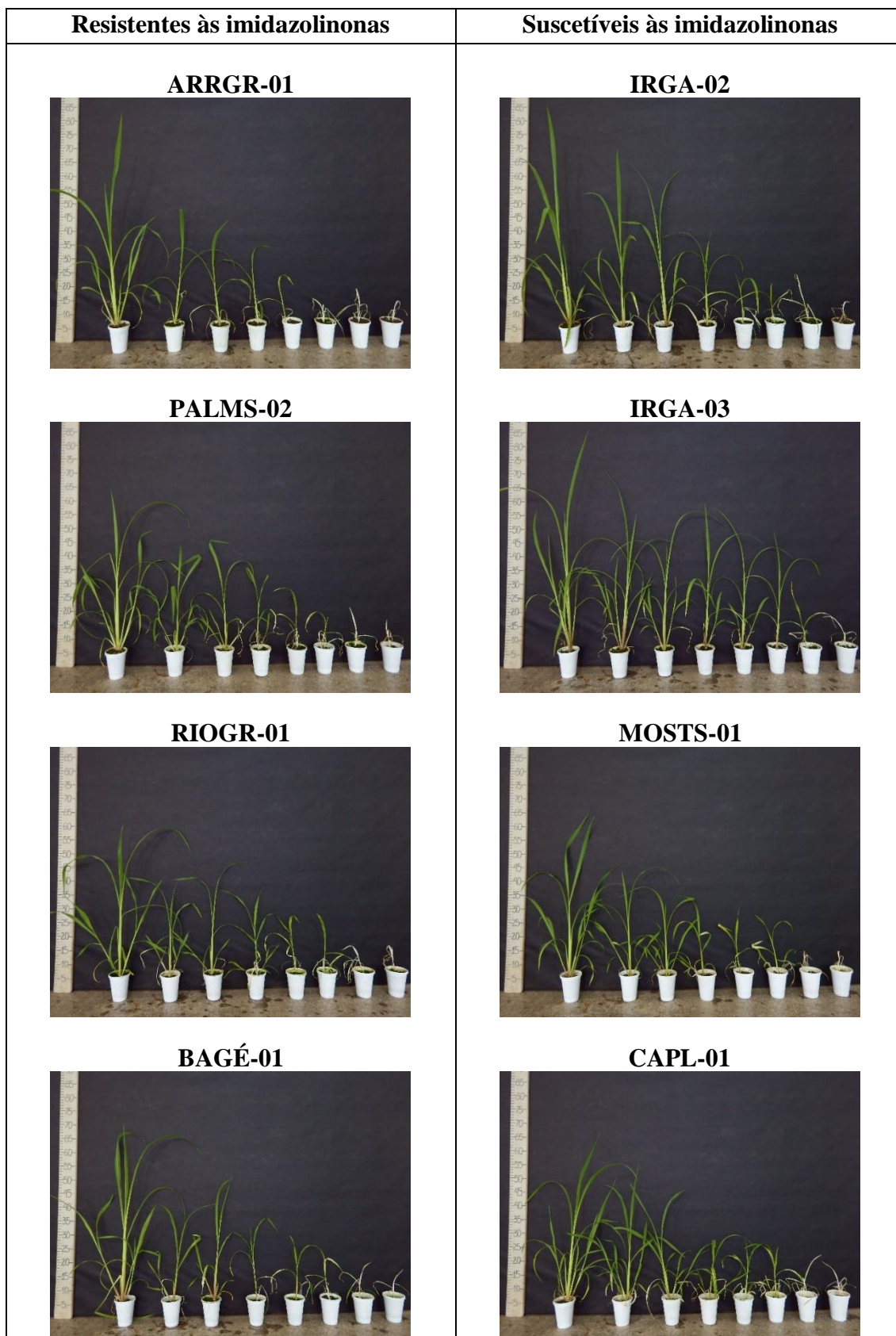


FIGURA 2. Biótipos resistentes (ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01) e suscetíveis (IRGA-02, IRGA-03, MOSTS-01 e CAPL-01) aos herbicidas imidazolinonas, 21 DAT com o herbicida clomazone via aspersão foliar.

No experimento com aplicação via hidroponia os dados de controle visual aos 7 e 14 DAT, índice de clorofila total, estatura de plantas, massa fresca e massa seca da parte aérea apresentaram interação significativa entre biótipos e doses de clomazone segundo a ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). A avaliação de controle visual aos 7 e 14 DAT mostram os biótipos BAGÉ-01 e RIOGR-01, resistentes às imidazolinonas, com  $C_{50}$  inferior em comparação ao suscetível IRGA-03 (Figura 3; Tabela 4; Tabela 5). O  $C_{50}$  do biótipo MOSTS-01 não diferiu significativamente dos resistentes.

As variáveis índice de clorofila total, estatura de plantas, massa fresca e massa seca da parte aérea indicam a ocorrência de RCN em ambos biótipos resistentes às imidazolinonas, RIOGR-01 e BAGÉ-01, na comparação com IRGA-03 (Figura 3; Tabela 4; Tabela 5). Os biótipos resistentes avaliados com aplicação de clomazone em hidroponia não apresentaram RCN na comparação com o suscetível MOSTS-01 (Tabela 5). A aplicação de clomazone em hidroponia corroborou com o experimento onde a aplicação foi realizada via aspersão foliar, no qual alguns biótipos resistentes não apresentaram RCN na comparação com MOSTS-01 (Tabela 3).

A realização do experimento com aplicação de clomazone via hidroponia é importante visto que este herbicida também é absorvido pelas raízes, e reforça os resultados da aplicação via aspersão foliar. Em ambos ensaios os biótipos RIOGR-01 e BAGÉ-01 necessitaram de doses inferiores de clomazone para reduzir seu crescimento para todas as variáveis estudadas na comparação com IRGA-03. O biótipo MOSTS-01 foi o menos tolerante entre os biótipos suscetíveis às imidazolinonas em ambos experimentos. A ocorrência de RCN foi dependente da variável analisada e do biótipo suscetível utilizado para comparação.

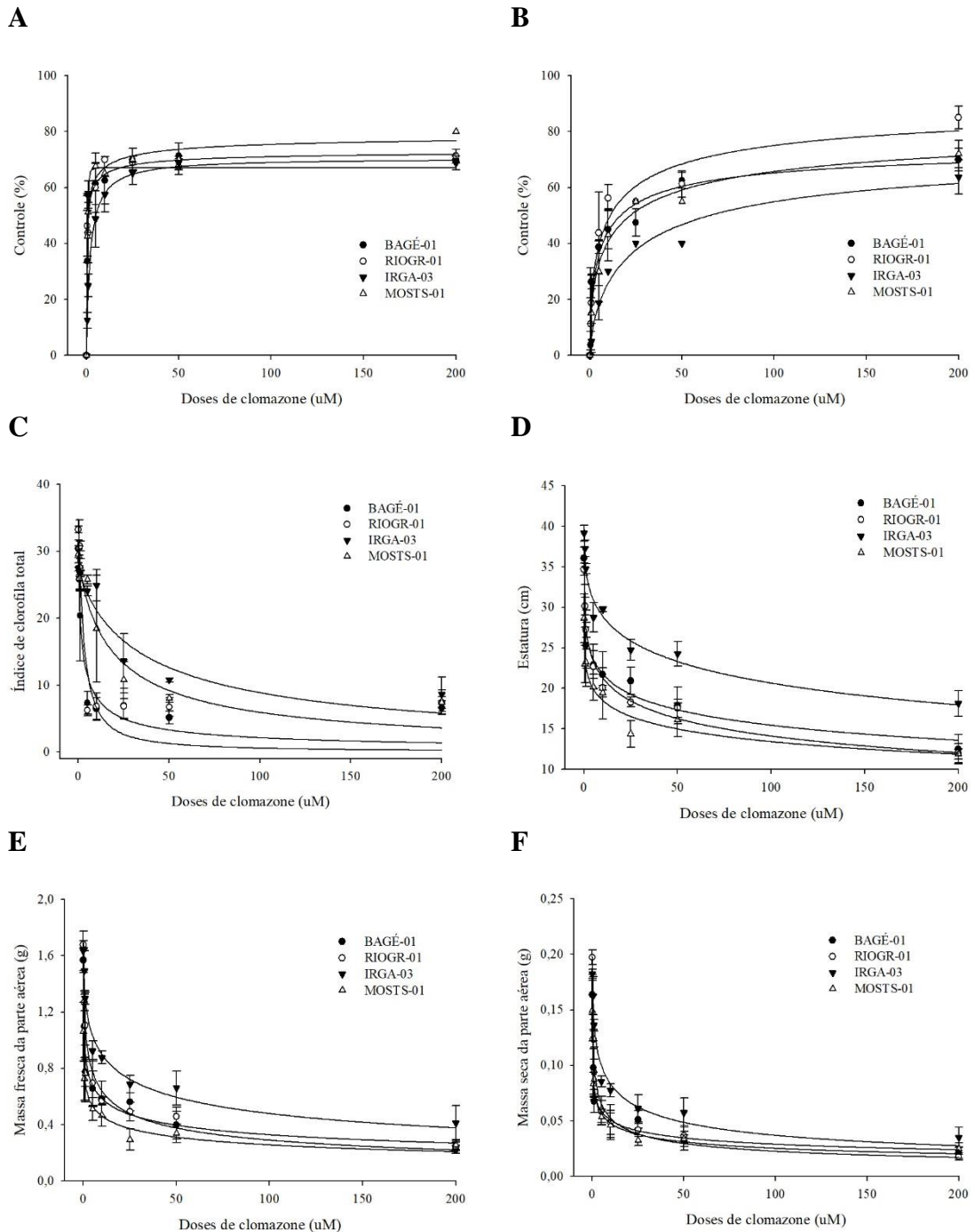


FIGURA 3. Controle visual 7 DAT (A), 14 DAT (B), Índice de clorofila total (C), estatura de planta (D), massa fresca da parte aérea (E), massa seca da parte aérea (E) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de dois biótipos resistentes (RIOGR-01 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) aos herbicidas imidazolinonas, tratados com clomazone via hidroponia. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.



TABELA 4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 7 e 14 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em dois biótipos resistentes (RIOGR-01 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via hidroponia.

Biótipo	Parâmetros equação logística			C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	EP GR <sub>50</sub> ou C <sub>50</sub>		R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X0</i>		Max	Min	
----- Controle visual (%) 7 DAT -----							
BAGÉ-01	67,141*	-2,439*	0,495*	0,77	(1,05	0,62)	0,84
RIOGR-01	73,656*	-0,559*	0,286*	1,09	(1,88	0,68)	0,91
IRGA-03	70,476*	-0,974*	2,078*	5,19	(5,82	4,59)	0,96
MOSTS-01	80,101*	-0,485*	0,334*	0,95	(1,15	0,76)	0,95
----- Controle visual (%) 14 DAT -----							
BAGÉ-01	88,198*	-0,548*	10,684 <sup>ns</sup>	17,46	(24,87	12,09)	0,93
RIOGR-01	93,339*	-0,576*	8,655 <sup>ns</sup>	11,09	(17,46	7,45)	0,9
IRGA-03	75,391*	-0,713*	25,051*	64,78	(66,04	57,82)	0,95
MOSTS-01	86,224*	-0,555*	12,255 <sup>ns</sup>	15,04	(27,46	1,55)	0,86
----- Índice de clorofila total -----							
BAGÉ-01	31,260*	0,671*	1,805*	1,96	(3,12	0,97)	0,83
RIOGR-01	34,934*	0,936*	2,508*	2,78	(4,10	1,56)	0,82
IRGA-03	27,995*	0,827*	39,444*	41,65	(53,70	29,81)	0,87
MOSTS-01	28,986*	0,931*	20,461*	19,64	(26,08	13,32)	0,86
----- Estatura de plantas (cm) -----							
BAGÉ-01	36,087*	0,318*	35,658*	35,74	(54,65	20,28)	0,9
RIOGR-01	34,897*	0,365*	35,854*	36,98	(46,63	28,21)	0,96
IRGA-03	39,607*	0,409*	112,311*	119,23	(149,17	91,37)	0,94
MOSTS-01	28,573*	0,340*	70,663*	69,93	(113,70	34,88)	0,84
----- Massa fresca da parte aérea (g) -----							
BAGÉ-01	1,577*	0,386*	2,316*	2,39	(3,78	1,27)	0,91
RIOGR-01	1,689*	0,447*	3,456*	3,56	(4,56	2,65)	0,96
IRGA-03	1,668*	0,479*	13,656*	14,88	(19,92	10,35)	0,93
MOSTS-01	1,071*	0,428*	5,279*	5,50	(9,37	2,48)	0,83
----- Massa seca da parte aérea (g) -----							
BAGÉ-01	0,163*	0,289*	0,591*	0,59	1,09	0,22)	0,91
RIOGR-01	0,198*	0,450*	0,947*	0,96	1,29	0,68)	0,96
IRGA-03	0,187*	0,511*	6,454*	7,18	9,62	4,98)	0,93
MOSTS-01	0,149*	0,376*	1,418*	1,43	2,36	0,70)	0,9

\*parâmetro estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup>parâmetro não significativo estatisticamente; C<sub>50</sub> = dose de clomazone necessária para controle de 50% (uM); GR<sub>50</sub> = dose de clomazone necessária para redução de 50% do crescimento (uM); EP = erro padrão da média.

TABELA 5. Fatores de resistência para as variáveis controle visual 7 e 14 DAT, índice de clorofila total, estatura de plantas e massa fresca e seca da parte aérea, através do cálculo  $FR = GR_{50} \text{ Resistente} / GR_{50} \text{ Suscetível}$ , comparando dois biótipos resistentes (BAGÉ-01 e RIOGR-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) aos herbicidas imidazolinonas, após aplicação de clomazone via hidroponia.

Fatores de resistência (FR)					
----- Controle visual 7 DAT -----			----- Estatura de plantas -----		
	IRGA-03	MOSTS-01		IRGA-03	MOSTS-01
BAGÉ-01	0,15*	0,81 <sup>ns</sup>	BAGÉ-01	0,30*	0,51 <sup>ns</sup>
RIOGR-01	0,21*	1,15 <sup>ns</sup>	RIOGR-01	0,31*	0,53 <sup>ns</sup>
----- Controle visual 14 DAT -----			----- Massa fresca da parte aérea -----		
	IRGA-03	MOSTS-01		IRGA-03	MOSTS-01
BAGÉ-01	0,27*	1,16 <sup>ns</sup>	BAGÉ-01	0,16*	0,43 <sup>ns</sup>
RIOGR-01	0,17*	0,74 <sup>ns</sup>	RIOGR-01	0,24*	0,65 <sup>ns</sup>
----- Índice de clorofila total -----			----- Massa seca da parte aérea -----		
	IRGA-03	MOSTS-01		IRGA-03	MOSTS-01
BAGÉ-01	0,05*	0,10*	BAGÉ-01	0,08*	0,41 <sup>ns</sup>
RIOGR-01	0,07*	0,14*	RIOGR-01	0,13*	0,67 <sup>ns</sup>

\*FR estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup>FR não significativo estatisticamente.

As plantas são capazes de biotransformar xenobióticos a partir de três fases de metabolização. As reações da fase I incluem oxidação, redução e hidrólise mediados pelas enzimas P450. Normalmente agem através da hidroxilação ou desalquilação adicionando um átomo de oxigênio à molécula. Esta fase geralmente é responsável por detoxificar compostos, aumentar a solubilidade e criar substratos para a fase II (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Na fase II ocorrem reações de conjugação com glutathiona, glucosyl e malonyl. Na fase seguinte, III, os conjugados são transportados e armazenados no vacúolo, ou incorporados a elementos estruturais da planta (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Estas fases de metabolização geralmente estão associadas à resistência e tolerância de plantas aos herbicidas, por impedirem que alcancem o local de ação. No entanto, alguns compostos fazem uso deste aparato enzimático para que sejam ativados. A bioativação é o processo através do qual pró-herbicidas, moléculas sem efeito herbicida, são enzimaticamente convertidos em compostos fitotóxicos para as plantas. O herbicida clomazone é um pró-

herbicida, e desta forma necessita ser ativado em 5-ketoclomazone (Figura 4). A enzima DXS teve sua atividade inibida em 47% apenas na presença do composto derivado 5-ketoclomazone, enquanto clomazone e seu metabólito 5-OH-clomazone não foram capazes de inibir a sua atividade (Ferhatoglu & Barrett, 2006). Não apenas o clomazone necessita de bioativação. Alguns herbicidas do grupo químico ariloxifenoxipropionatos, como diclofop-methyl e fenoxaprop-ethyl, inibidores da enzima ACCase, também são considerados pró-herbicidas (Cummins *et al.*, 2001).

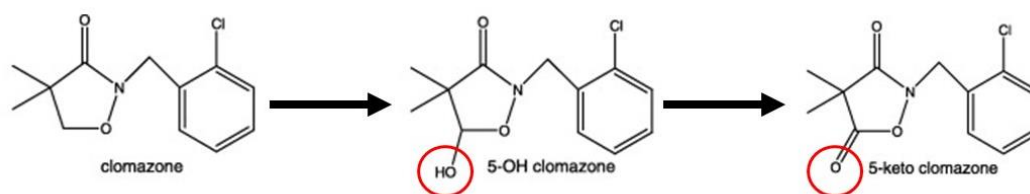


FIGURA 4. Rota de metabolização do herbicida clomazone mediada por enzimas P450 em plantas sensíveis (adaptado de Yasuor *et al.*, 2010).

A resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da enzima ALS devido ao incremento na taxa de metabolização dos herbicidas já foi verificada em diversos estudos (Matzenbacher *et al.*, 2014; Iwakami *et al.*, 2014a). O aumento na expressão dos genes *CYP81A12* e *CYP81A21* é responsável pela resistência ao penoxsulam e bensulfuron-methyl, e *CYP71AK2* e *CYP72A254* pela resistência ao bispyribac-sodium em *E. phyllopogon* (Iwakami *et al.*, 2014a; Iwakami *et al.*, 2014b). Em *E. crus-galli*, o aumento de aproximadamente dez vezes a expressão do gene *CYP81A6* pode estar associado à resistência ao herbicida imazethapyr (Dalazen, 2016). Desta forma, devido à necessidade da bioativação do clomazone, é esperado que plantas com maior expressão de genes codificadores de enzimas P450, que realizam a oxidação e consequente ativação do clomazone, tenham a toxicidade aumentada a este herbicida. Isto é confirmado pelos resultados encontrados nos experimentos de aplicação de clomazone via aspersão foliar e

via hidroponia (Tabela 2; Tabela 3; Tabela 4; Tabela 5). Os biótipos ARRGR-01, PALMS-02, RIOGR-01 e BAGÉ-01, todos resistentes às imidazolinonas devido ao incremento na taxa de metabolização via enzimas P450, apresentaram maior suscetibilidade ao clomazone em comparação principalmente com dois biótipos sensíveis aos herbicidas ALS, IRGA-02 e IRGA-03 (Tabela 2; Tabela 3). Plantas mais sensíveis ao clomazone metabolizam o herbicida mais rapidamente ou em maior quantidade na comparação com plantas mais tolerantes (Tenbrook & Tjeerdema, 2006). Neste mesmo sentido, a concentração do metabólito 5-ketoclomazone encontrada em *E. oryzoides*, espécie mais sensível, foi estatisticamente superior à encontrada em arroz, espécie mais tolerante, sendo de 21 e 5.7 pmol g<sup>-1</sup> respectivamente (Tenbrook & Tjeerdema, 2006).

A ocorrência de RCN foi relatada em *E. crus-galli* resistente às triazinas devido à mutação Ser264 do gene *psbA*, codificador da proteína D1 (Gadamski *et al.*, 2000). O biótipo resistente apresentou maior suscetibilidade aos herbicidas fluazifop-butyl (FR = 0,03), inibidor da enzima ACCase, e metolachlor (FR=0,49), inibidor da divisão celular, em comparação ao suscetível. No mesmo estudo, *Conyza canadensis* também resistente às triazinas apresentou RCN ao pyridate (0,14), MCPA (FR = 0,12), fluroxypyr (FR=0,52) e glyphosate (FR=0,38) (Gadamski *et al.*, 2000). A resistência às triazinas confere um custo de adaptação aos biótipos resistentes. A alteração Ser264 não compromete de forma vital a ligação da plastoquinona na proteína D1, no entanto a transferência de elétrons é menos eficiente, reduzindo parâmetros fotossintéticos da planta e, conseqüentemente, seu crescimento (Ahrens & Stoller, 1983). Esta penalidade pode ser responsável por tornar plantas resistentes às triazinas mais suscetíveis a outros herbicidas (Gadamski *et al.*, 2000).

Embora pouco relatada na literatura, a RCN na maior parte dos estudos está relacionada à ocorrência de plantas resistentes às triazinas. *Cyperus difformis* resistente ao herbicida propanil tem sua sensibilidade aumentada ao herbicida bentazon devido à mutação Val219Ile no gene *psbA* (Pedroso *et al.*, 2016). Substituições de aminoácidos que resultem

em resistência a determinado herbicida podem alterar a conformação da proteína e aumentar a afinidade do local de ação a outros herbicidas de mesmo mecanismo de ação (Kless *et al.*, 1994). Neste mesmo sentido, *Amaranthus hybridus* resistente ao herbicida imazethapyr apresenta sensibilidade aumentada ao herbicida cloransulam-methyl, ambos inibidores da enzima ALS (Poston *et al.*, 2001). Essa tolerância diferencial não foi explicada por diferenças na absorção, translocação ou metabolização. Em ensaio enzimático, a enzima ALS do biótipo resistente mostrou-se 25 vezes mais sensível a cloransulam-methyl em relação à enzima ALS do biótipo suscetível.

A ocorrência de RCN é verificada não apenas em plantas, mas também em insetos. Verifica-se que o mecanismo de resistência devido ao incremento na taxa de metabolização de inseticidas piretroides, mediada por enzimas P450, também é responsável pela RCN em insetos, assim como o presente estudo mostra em *E. crus-galli*. Populações de *Aedes aegypti* e *Musca domestica* que possuem esse mecanismo de resistência são mais sensíveis ao inseticida chlorfenapyr (Paul *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2004). Nesse estudo, o uso do inibidor de metabolização PBO reverteu a RCN. Similarmente ao clomazone, o chlorfenapyr é um pró-inseticida e necessita de ativação enzimática (Raghavendra *et al.*, 2011).

A identificação da ocorrência de RCN possui aplicabilidade como descoberta de interação entre herbicidas em relação a processos fisiológicos das plantas. O estudo e compreensão do mecanismo de resistência das plantas daninhas é essencial para a aplicabilidade da RCN. O uso de associação ou rotação de herbicidas com RCN pode ser capaz de prevenir, retardar ou suprimir o surgimento de populações de plantas daninhas resistentes em áreas com alta pressão de seleção (Gadamski *et al.*, 2000). A taxa de evolução de biótipos resistentes diminui quando é utilizado um herbicida com forte RCN (Gressel & Segel, 1990). A relação entre mecanismo de resistência e a RCN a determinado herbicida possibilita o manejo da resistência com os herbicidas disponíveis no mercado, visto a falta de perspectiva de lançamento de novos mecanismos de ação. A descoberta de RCN ao

herbicida clomazone em capim-arroz é particularmente importante, pois a aplicação desse herbicida representa um mecanismo de ação adicional para o manejo de plantas resistentes, além de conferir residual no solo e ser de baixa probabilidade a evolução da resistência.

### 5.3.2 Aplicação do herbicida clomazone + inibidor de metabolização

Os dados de controle visual aos 14 e 21 dias após o tratamento (DAT), índice de clorofila total, estatura de plantas, massa fresca e massa seca da parte aérea com aplicação de clomazone via aspersão foliar apresentaram interação significativa na análise de variância (ANOVA) entre biótipos, doses e presença ou ausência de inibidor de metabolização ( $p \leq 0,05$ ). O controle visual aos 14 DAT mostra que apenas o biótipo RIOGR-01 apresentou RCN quando comparado com IRGA-03, sem a presença de malathion (Tabela 6; Figura 6; Figura 7; Figura 8). Aos 21 DAT ambos biótipos resistentes às imidazolinonas, ARRGR-01 e RIOGR-01, apresentaram  $C_{50}$  inferior ao IRGA-03, suscetível. Contudo, tanto aos 14 como 21 DAT, a aplicação prévia do inibidor de metabolização reverteu a RCN, não havendo diferença significativa entre os biótipos para as doses de  $C_{50}$  e o FR.

As variáveis índice de clorofila total, estatura de plantas, massa seca e massa verde da parte aérea comportaram-se de forma similar. Na ausência de inibidor de metabolização, os biótipos resistentes ARRGR-01 e RIOGR-01 apresentaram FR significativamente menor que 1 ( $FR < 1$ ) quando comparados ao suscetível IRGA-03. Quando a aplicação de malathion foi realizada previamente ao herbicida, não verificou-se diferenças estatisticamente significativas entre as doses de  $GR_{50}$ .

Os resultados comprovam que o herbicida clomazone necessita da participação das enzimas P450 para que ocorra sua ativação, pois a presença de inibidor de metabolização reduziu as injúrias, assim como verificado em outros estudos (Ferhatoglu *et al.*, 2005). Os inseticidas organofosforados, como malathion, são amplamente conhecidos e utilizados em experimentos como inibidores de enzimas P450. No presente estudo, os resultados

relacionados ao controle visual aos 21 DAT, índice de clorofila, estatura de plantas, massa fresca e seca da parte aérea indicam que a aplicação de malathion reverteu a RCN. Isso deve-se ao fato de ocorrer inibição das enzimas P450 nos biótipos que as possuem em maiores quantidades, impedindo que ocorra maior ativação do herbicida clomazone (Figura 5). A aplicação de phorate, outro inibidor de enzimas P450, previamente ao clomazone reduziu a quantidade de metabólitos dependentes de NADPH extraíveis em algodão (Ferhatoglu *et al.*, 2005). Metabólitos dependentes de NADPH indicam que a reação é provavelmente catalisada por enzimas P450 (Ferhatoglu *et al.*, 2005).

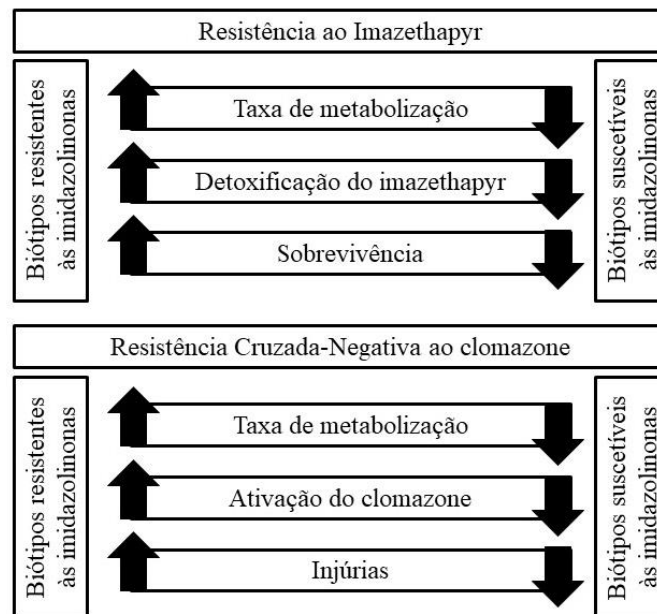


FIGURA 5. Relação entre o mecanismo de resistência ao imazethapyr e a ocorrência de resistência cruzada negativa ao clomazone em *Echinochloa crus-galli*.

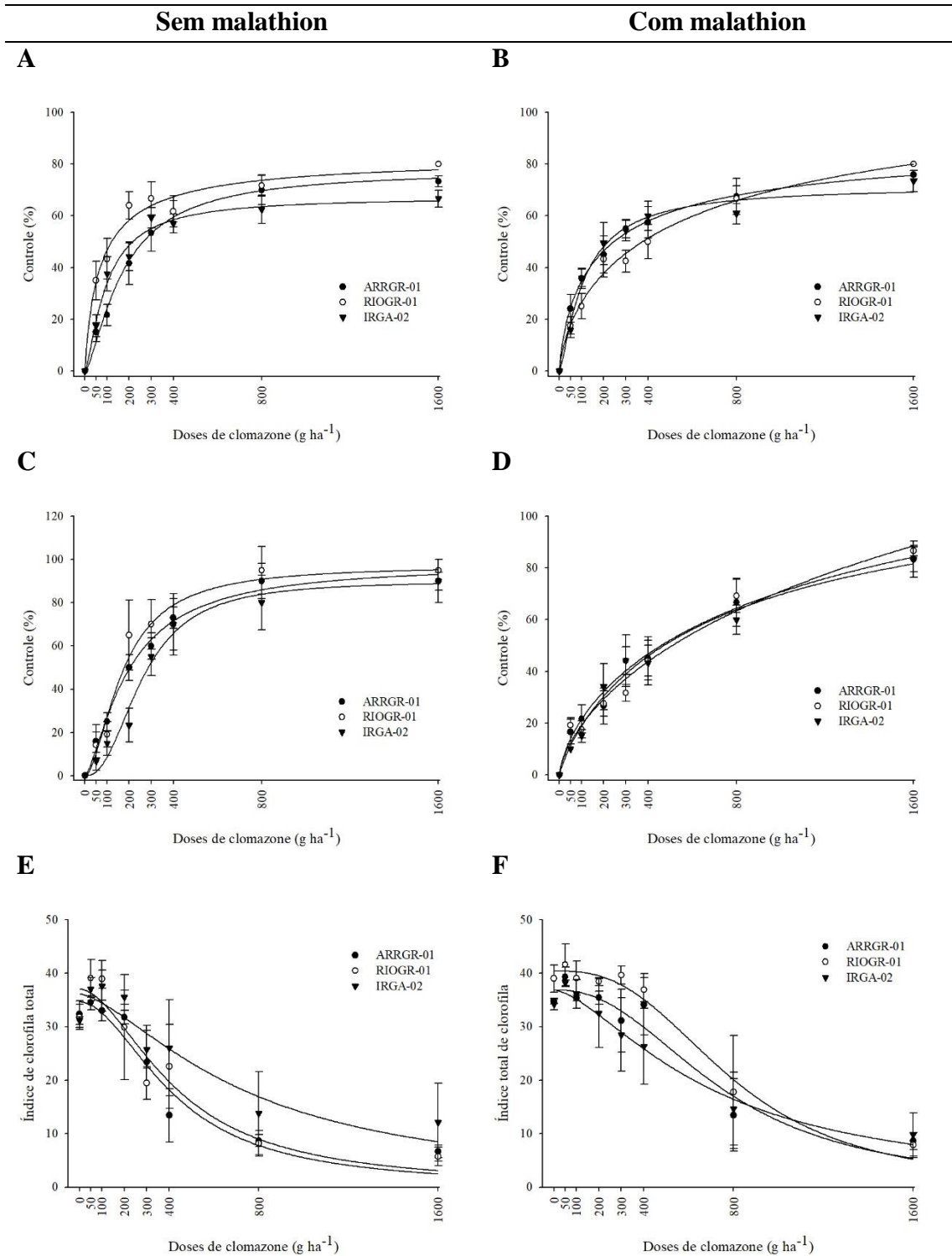


FIGURA 6. Controle visual 14 DAT (A, B), controle visual 21 DAT (C, D) e índice de clorofila total (E, F) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01 e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450 e tratados com clomazone via aspersão foliar. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.



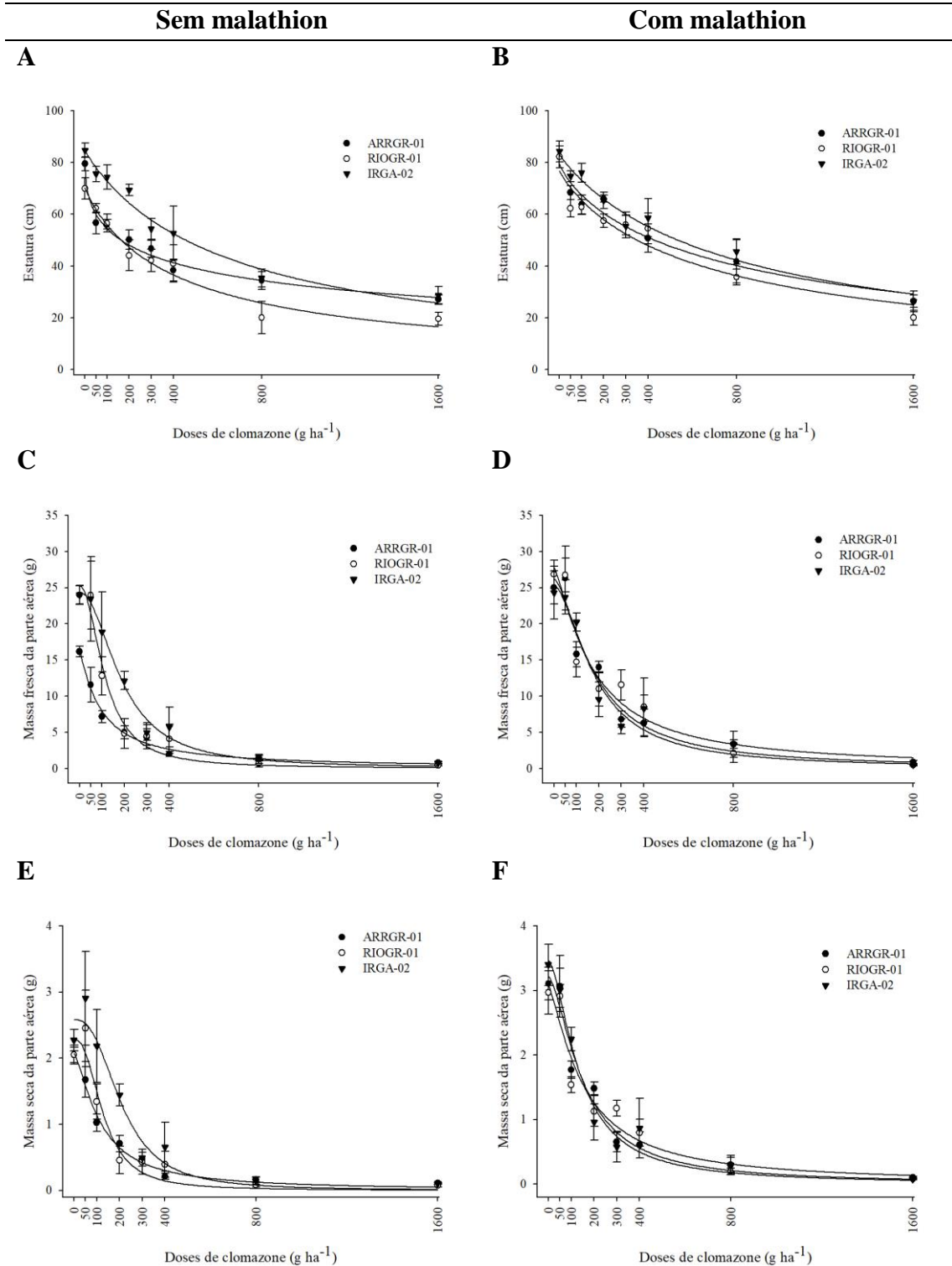


FIGURA 7. Estatura de planta (A, B), massa fresca (C, D) e massa seca da parte aérea (E, F) ajustadas pela equação log-logística de três parâmetros, em função de dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01 e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450 e tratados com clomazone via aspersão foliar. Valores representam a média, e as barras verticais o intervalo de confiança 5%.

TABELA 6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01) e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450, e tratados com clomazone via aspersão foliar

Biótipo	Parâmetros equação logística			EP C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>				R <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	X0	C <sub>50</sub> ou GR <sub>50</sub>	Max	Min	FR	
----- Controle visual (%) 14DAT -----								
Sem malathion								
ARRGR-01	77,661*	-1,419*	173,421*	263,18	(277,25	248,03)	1,22*	0,94
RIOGR-01	83,247*	-0,863*	74,794*	119,99	(128,50	101,47)	0,56*	0,97
IRGA-02	67,198*	-1,360*	97,931*	214,62	(235,58	196,71)	-	0,93
Com malathion								
ARRGR-01	90,645*	-0,751*	186,397*	245,55	(273,74	217,73)	1,11 <sup>ns</sup>	0,93
RIOGR-01	123,287*	-0,686*	653,602 <sup>ns</sup>	374,32	(493,27	248,97)	1,69*	0,94
IRGA-02	71,504*	-1,273*	113,865*	220,90	(238,78	204,02)	-	0,93
----- Controle visual (%) 21 DAT -----								
Sem malathion								
ARRGR-01	97,890*	-1,409*	197,283*	203,410	(208,506	194,901)	0,71*	0,99
RIOGR-01	97,147*	-1,733*	171,740*	177,660	(186,118	160,817)	0,62*	0,95
IRGA-02	89,989*	-2,338*	260,364*	286,463	(300,175	268,214)	-	0,97
Com malathion								
ARRGR-01	165,308*	-0,698*	1515,843 <sup>ns</sup>	458,51	(1187,34	-414,75)	0,97 <sup>ns</sup>	0,9
RIOGR-01	274,819 <sup>ns</sup>	-0,663*	4904,608 <sup>ns</sup>	509,25	(4947,47	-6088,84)	1,08 <sup>ns</sup>	0,94
IRGA-02	124,495*	-0,851*	752,134 <sup>ns</sup>	470,91	(623,18	319,77)	-	0,91
----- Índice de clorofila total -----								
Sem malathion								
ARRGR-01	34,623*	1,931*	422,814*	452,67	(514,80	386,21)	0,51*	0,85
RIOGR-01	37,034*	1,830*	429,793*	501,41	(584,47	412,69)	0,57*	0,79
IRGA-02	36,111*	1,521*	736,288*	882,52	(1054,20	701,27)	-	0,72
Com malathion								
ARRGR-01	36,781*	2,491*	734,520*	768,59	(859,12	672,25)	1,02 <sup>ns</sup>	0,81
RIOGR-01	40,411*	2,748*	797,147*	817,58	(890,53	740,99)	1,09 <sup>ns</sup>	0,9
IRGA-02	36,904*	1,567*	684,759*	750,97	(892,43	600,73)	-	0,75
----- Estatura (cm) -----								
Sem malathion								
ARRGR-01	79,159*	0,508*	472,701*	464,77	(555,85	369,25)	0,71*	0,92
RIOGR-01	70,187*	0,907*	448,722*	452,56	(541,15	365,05)	0,69*	0,87
IRGA-02	84,588*	0,962*	659,897*	658,64	(759,70	557,21)	-	0,89
Com malathion								
ARRGR-01	79,920*	0,788*	818,132*	761,84	(918,05	609,06)	0,95 <sup>ns</sup>	0,86
RIOGR-01	76,109*	0,933*	717,470*	604,14	(729,05	481,35)	0,75 <sup>ns</sup>	0,90
IRGA-02	83,158*	0,961*	825,720*	801,84	(923,14	680,31)	-	0,89

Continua

Continuação TABELA 6. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis controle visual 14 e 21 DAT, índice de clorofila total, estatura de planta, massa fresca e seca da parte aérea, em dois biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01) e um suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas, com e sem inibidor de enzimas P450, e tratados com clomazone via aspersão foliar

----- Massa fresca da parte aérea (g) -----								
Sem malathion								
ARRGR-01	16,259*	1,142*	96,493*	97,32	(112,49	82,21)	0,51*	0,93
RIOGR-01	25,120*	1,961*	113,711*	119,01	(134,81	102,58)	0,62*	0,89
IRGA-02	24,341*	2,057*	188,219*	190,80	(220,74	158,89)	-	0,85
Com malathion								
ARRGR-01	26,245*	1,565*	179,881*	190,73	(220,48	160,02)	0,95 <sup>ns</sup>	0,88
RIOGR-01	27,810*	1,320*	172,711*	181,97	(214,02	149,44)	0,91 <sup>ns</sup>	0,88
IRGA-02	25,192*	1,689*	191,872*	199,90	(229,70	168,91)	-	0,88
----- Massa seca da parte aérea (g) -----								
Sem malathion								
ARRGR-01	2,070*	1,427*	115,266*	117,07	(131,10	102,89)	0,51*	0,94
RIOGR-01	2,256*	2,263*	130,820*	141,87	(161,47	121,14)	0,61*	0,84
IRGA-02	2,553*	2,654*	213,054*	231,70	(259,86	201,33)	-	0,81
Com malathion								
ARRGR-01	3,219*	1,605*	149,043*	155,71	(177,19	133,68)	1,09 <sup>ns</sup>	0,91
RIOGR-01	3,077*	1,349*	154,872*	163,28	(189,16	137,04)	1,14 <sup>ns</sup>	0,9
IRGA-02	3,455*	1,616*	140,139*	143,06	(163,62	122,00)	-	0,91

\*estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup> não significativo estatisticamente;  $C_{50}$  = dose de clomazone necessária para controle de 50% ( $\text{g} \cdot \text{ha}^{-1}$ );  $GR_{50}$  = dose de clomazone necessária para redução de 50% do crescimento ( $\text{g} \cdot \text{ha}^{-1}$ ); EP = erro padrão da média; FR = fator de resistência. FR =  $GR_{50}$  Resistente/ $GR_{50}$  Suscetível.

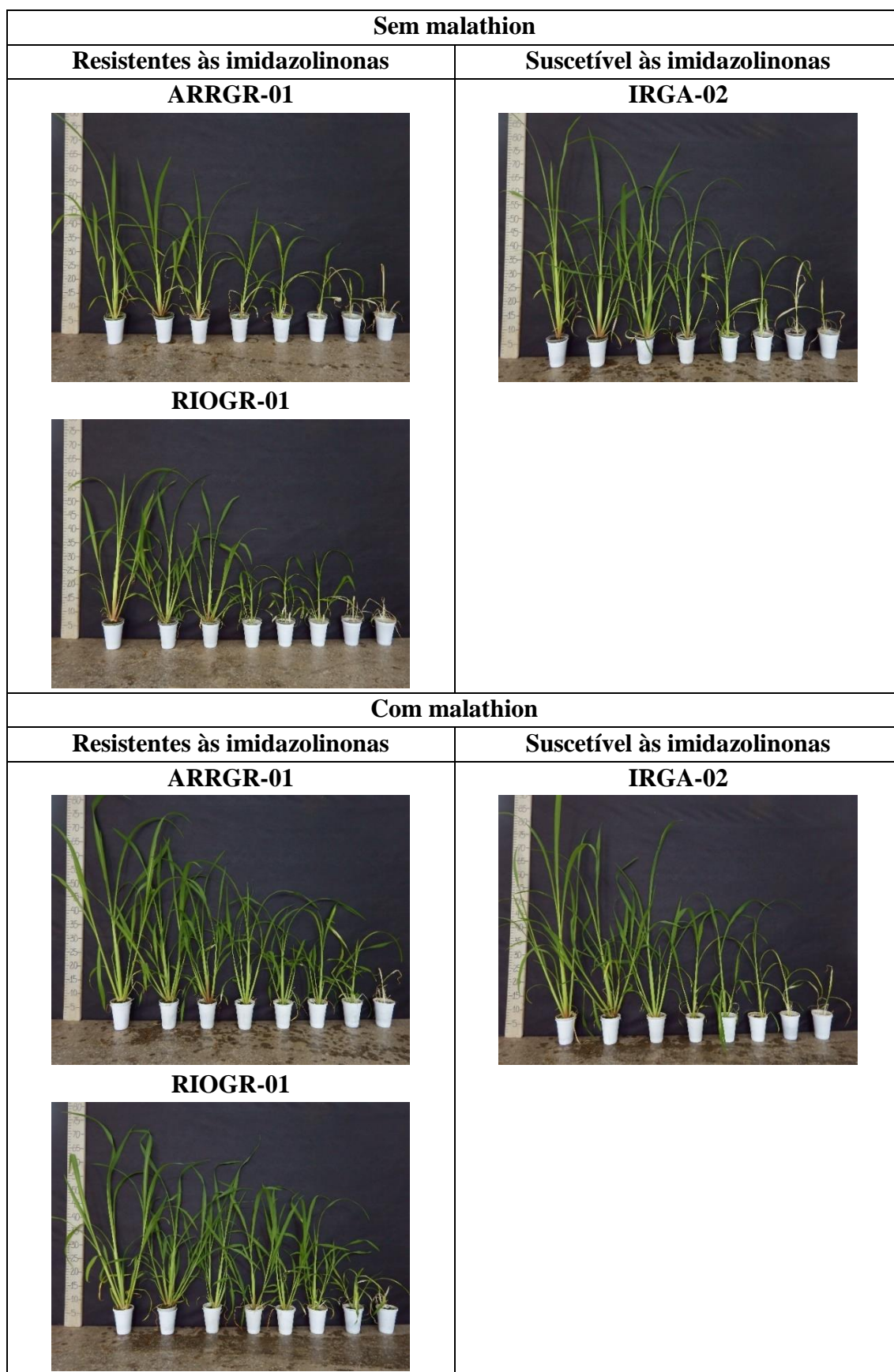


FIGURA 8. Biótipos resistentes (ARRGR-01 e RIOGR-01) e suscetível (IRGA-02) aos herbicidas imidazolinonas 21 DAT com e sem inibidor de enzimas P450 e tratados com clomazone via aspersão foliar.

As enzimas P450 podem também desempenhar um papel importante para a detoxificação de clomazone além de participar na sua ativação (Yasuor *et al.*, 2008). Isto é possível pelo fato da família de genes *CYP* ser grande, diversa e com especificidade de substratos variados (Werck-Reichhart *et al.*, 2000). São relatados casos de resistência ao clomazone em *E. phyllopogon*, sendo que nessas plantas o composto tóxico 5-ketoclomazone não é formado ou é rapidamente detoxificado (Yasuor *et al.*, 2008). Plantas resistentes convertem preferencialmente o clomazone em 5-hidroxiclomazone e na sequência no derivado di-hidroxilado, ao invés de 5-ketoclomazone, enquanto que plantas sensíveis acumulam de 2,5 vezes mais 5-ketoclomazone (Yasuor *et al.*, 2010). No entanto essa detoxificação provavelmente envolva também outros mecanismos de detoxificação do 5-ketoclomazone não dependentes de P450, como por exemplo reações de conjugação (Yasuor *et al.*, 2008).

### 5.3.3 Atividade de enzimas antioxidantes

A quantidade de unidades ativas de SOD apresentou diferença significativa na análise de variância (ANOVA -  $p \leq 0,05$ ) entre biótipos apenas na ausência do herbicida clomazone. O biótipo RIOGR-01 apresentou a maior quantidade de unidades ativas de SOD, não diferindo do ARRGR-01, enquanto os demais biótipos foram inferiores ao RIOGR-01 (Tabela 7). A enzima SOD constitui a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta enzima neutraliza o superóxido, que é muito reativo, em oxigênio e  $H_2O_2$  com uma taxa 104 vezes mais rápida em comparação com a reação espontânea de dismutação. A SOD possui um papel central na defesa contra estresse oxidativo (Alscher *et al.*, 2002).

TABELA 7. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) com e sem aplicação do herbicida clomazone, 24 horas após a aplicação em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, RIOGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) às imidazolinonas.

Biótipos	SOD (U.A.mg prot <sup>-1</sup> )	
	Controle	Clomazone
ARRGR-01	50.310 AB	43.447 A
RIOGR-01	58.948 A	53.073 A
PALMS-02	38.766 B	31.579 A
BAGÉ-01	35.030 B	42.722 A
IRGA-03	34.929 B	35.588 A
MOSTS-01	32.608 B	37.498 A
MÉDIA	41,765	40,651
C.V. (%)	17,55	24,32

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente na coluna pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os dados de atividade da enzima APX, com e sem clomazone, apresentaram diferença significativa na análise de variância (ANOVA -  $p \leq 0,05$ ). O biótipo RIOGR-01 apresentou a maior atividade dessa enzima na presença e ausência do herbicida, no entanto não diferiu estatisticamente dos biótipos ARRGR-01, PALMS-02, BAGÉ-01 e IRGA-03 (Tabela 8). Esses biótipos, no entanto, não diferiram do MOSTS-01, que por sua vez apresentou a menor atividade da enzima APX. A atividade da enzima CAT não diferiu estatisticamente entre os biótipos na ausência de clomazone segundo a análise de variância (ANOVA -  $p \leq 0,05$ ). Na presença do herbicida houve atividade enzimática diferencial entre os biótipos, sendo ARRGR-01, RIOGR-01, BAGÉ-01 e MOSTS-01 os que apresentaram a maior atividade da APX, enquanto IRGA-03 e PALMS-02 a menor (Tabela 8).

A APX e a CAT são as duas enzimas mais importantes dentre os componentes de desintoxicação do  $H_2O_2$  formado pela SOD (Bhatt & Tripathi, 2011). A CAT catalisa a dismutação de  $H_2O_2$  em água e oxigênio. É a única enzima de degradação do  $H_2O_2$  que não utiliza equivalentes de redução celular. Portanto, quando as células são estressadas e geram rapidamente  $H_2O_2$ , este é degradado pela CAT de uma maneira eficiente em termos energéticos. A atividade da CAT é efetiva principalmente em concentrações relativamente altas de  $H_2O_2$  (Sharma *et al.*, 2012). A APX atua no ciclo ascorbato-glutationa utilizando

duas moléculas de ácido ascórbico para reduzir  $H_2O_2$  em água e monodehidroascorbato, e permite a eliminação do  $H_2O_2$  mesmo em baixas concentrações (Sharma *et al.*, 2012).

TABELA 8. Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) com e sem aplicação do herbicida clomazone, 24 horas após a aplicação em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, RIOGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) às imidazolinonas.

Biótipos	APX ( $\mu\text{mol min mg prot}^{-1}$ )		CAT ( $\mu\text{mol min mg prot}^{-1}$ )	
	Controle	Clomazone	Controle	Clomazone
ARRGR-01	0,8455 AB	0,7395 AB	0,1786 A	0,1652 A
RIOGR-01	1,1664 A	1,6575 A	0,1629 A	0,1984 A
PALMS-02	1,0435 AB	0,7126 AB	0,1242 A	0,0987 B
BAGÉ-01	0,9524 AB	1,6476 A	0,1040 A	0,2060 A
IRGA-03	0,6614 AB	0,7150 AB	0,1195 A	0,1030 B
MOSTS-01	0,4885 B	0,4403 B	0,1431 A	0,1668 A
MÉDIA	0,8596	0,9854	0,1387	0,1563
C.V. (%)	24,29	39,12	26,97	11,53

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente na coluna pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O sistema enzimático antioxidante compreende outras enzimas além das avaliadas neste estudo, como guaiacol peroxidase (GPX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR). Essas enzimas operam em diferentes compartimentos subcelulares e respondem em conjunto quando as células são expostas ao estresse oxidativos (Sharma *et al.*, 2012). Fazem parte deste sistema também componentes não enzimáticos como glutathiona (GSH), ascorbato (AsA), carotenoides e tocoferóis (Sharma *et al.*, 2012).

O  $H_2O_2$  foi quantificado em plantas tratadas e não tratadas com clomazone, 24 e 72 HAA. Observou-se diferença estatística significativa segundo o teste da análise de variância (ANOVA -  $p \leq 0,05$ ) entre biótipos apenas em plantas tratadas com clomazone e coletadas 24 HAA (Tabela 9). O maior acúmulo de  $H_2O_2$  foi observado no biótipo MOSTS-01, não diferindo do ARRGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01, sendo que RIOGR-01 e IRGA-03 foram os que menos acumularam este composto. O  $H_2O_2$  é um ROS moderadamente reativo com uma meia-vida relativamente longa. Seus principais efeitos negativos estão principalmente

na formação de OH\*, que é o ROS mais reativo (Karuppanapandian et al, 2011). Seu pequeno tamanho difunde os danos pois atravessa membranas celulares e migra entre organelas, atuando também como mensageiro em condições de estresse (Karuppanapandian et al, 2011).

TABELA 9. Quantificação de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) com e sem aplicação do herbicida clomazone, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA), em quatro biótipos resistentes (ARRGR-01, RIOGR-01, PALMS-02 e BAGÉ-01) e dois suscetíveis (IRGA-03 e MOSTS-01) às imidazolinonas.

Biótipos	24 HAA		72 HAA	
	Controle	Clomazone	Controle	Clomazone
ARRGR-01	0,328 A	0,294 AB	0,034 A	0,024 A
RIOGR-01	0,289 A	0,202 B	0,027 A	0,019 A
PALMS-02	0,280 A	0,263 AB	0,041 A	0,027 A
BAGÉ-01	0,277 A	0,234 AB	0,023 A	0,017 A
IRGA-03	0,255 A	0,211 B	0,037 A	0,020 A
MOSTS-01	0,351 A	0,321 A	0,051 A	0,030 A
MÉDIA	0,297	0,254	0,036	0,023
C.V. (%)	23,41	14,3	31,13	24,18

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente na coluna pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O herbicida clomazone impede a síntese de pigmentos, como os carotenoides (Ferhatoglu & Barrett, 2006). Quando carotenoides estão ausentes e as plantas são expostas à luz, oxigênio *singlet* e clorofilas *triplet* são formados, e então degradam a clorofila e iniciam a peroxidação de lipídios (Hess, 2000). Desta forma, um sistema antioxidante mais efetivo poderia diminuir os efeitos do herbicida. Contudo, neste estudo não foi verificada atividade enzimática que possa ser relacionada com a ocorrência de RCN. Não houve estratificação entre os biótipos resistentes e os suscetíveis às imidazolinonas na avaliação da atividade das enzimas CAT, APX e SOD. Os resultados da quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  também não explicam a ocorrência de RCN.



#### 5.4. Conclusão

A aplicação através de aspersão foliar e em hidroponia do herbicida clomazone indica a ocorrência de resistência cruzada negativa nos biótipos de capim-arroz com resistência às imidazolinonas por incremento na taxa de metabolização. Foi verificada RCN de todos os biótipos resistentes às imidazolinonas quando comparados com dois dos quatro biótipos suscetíveis. O grau de RCN foi dependente da variável analisada e do biótipo suscetível utilizado para comparação. A comparação de vários biótipos resistentes com vários suscetíveis indicou que a ocorrência deste fenômeno não é ao acaso, e está relacionada ao mecanismo de incremento de metabolização.

A ocorrência de RCN está associada à maior ativação do pró-herbicida clomazone pelas enzimas P450, que conferem resistência a imazethapyr. A capacidade diferencial de detoxificar o estresse oxidativo através das enzimas SOD, CAT e APX parece não estar relacionada com a RCN.

A RCN pode ser uma estratégia importante no manejo de plantas daninhas resistentes. A aplicação de herbicidas com RCN para determinado mecanismo de resistência pode suprimir as plantas resistentes, visto que são mais sensíveis a este, ou quando aplicado em rotação com outros herbicidas pode atrasar a evolução da mesma. O estudo e compreensão do mecanismo de resistência das plantas daninhas é essencial para a aplicabilidade da RCN.

Em particular a verificação de RCN ao herbicida clomazone é importante pois o uso deste herbicida vem ganhando força devido ao cenário de ampla distribuição da resistência aos principais mecanismos de ação até então utilizados nas lavouras de arroz. Este herbicida apresenta também raros casos de evolução da resistência, e possui flexibilidade de aplicação, podendo ser em pré ou pós-emergência.

## 5.5 Referências bibliográficas

AHRENS, W.H.; STOLLER, E. W. Competition, growth rate and CO<sub>2</sub> fixation in triazine susceptible and resistant smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). **Weed Science**, Champaign, v. 31, n. 4, p.438–444, 1983.

ALSCHER, R. G. *et al.* Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.

BECKIE, H.J. *et al.* Negative Cross-Resistance of Acetolactate Synthase Inhibitor–Resistant Kochia (*Kochia scoparia*) to Protoporphyrinogen Oxidase– and Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase–Inhibiting Herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v. 26, n. 3, p.570-574, 2012.

BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.29, n.6, p.850-859, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, n.1-2, v.72, p.248–254, 1976.

CUMMINS, I. *et al.* Biochemical characterisation of esterases active in hydrolysing xenobiotics in wheat and competing weeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.113, n.4, p.477-485, 2001.

DALAZEN, G. **Avaliação de genes relacionados ao incremento de metabolização e efeito da temperatura e da concentração de CO<sub>2</sub> em capim-arroz resistente a imazethapyr**. 2016. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

DÉLYE, C. *et al.* Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, London, v. 29, n.11, p.649-658, 2013.

FERHATOGLU, Y. *et al.* The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.81, n.1, p.59-70, 2005.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 85, n. 1, p.7–14, 2006.

GADAMSKI, G. *et al.* Negative Cross-Resistance in Triazine-Resistant Biotypes of *Echinochloa crus-galli* and *Conyza canadensis*. **Weed Science**, Champaign, v.48, n. 2, p.176-180, 2000.

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.C. Non-target Site Mechanisms of Resistance to Herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.36, n. 1, p.24-34, 2017.

GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. Negative cross resistance; a possible key to atrazine resistance management: a call for whole plant data. **Zeitschrift für Naturforsch**, Tübingen, v.45, p.470–473, 1990.

HESS, F.D. Light-dependent herbicides – an overview. **Weed Science**, Champaign, v.48, n.2, p.160–170, 2000.

IWAKAMI, S. *et al.* Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. **Pest Management Science**, Malden, v.68, n.7, p.1098-1106, 2012.

IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, 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**, Malden, v.70, n.4, p. 549-558, 2014b.

KARUPPANAPANDIAN, T. *et al.* Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.5, n.6, p.709-725, 2011.

KLESS, H. M. *et al.* The D-E region of the D1 protein is involved in multiple quinone and herbicide interactions in photosystem II. **Biochemistry**, Washington, v.33, n.34, p.10501-10507, 1994.

MATZENBACHER, F.O. **Caracterização e controle de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente aos herbicidas imidazolinonas e quinclorac**. 2012. 207 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

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**, London, v.153, n. 6, p.1044-1058, 2014.

PEDROSO, R. M. *et al.* A psbA mutation (Val219 to Ile) causes resistance to propanil and increased susceptibility to bentazon in *Cyperus difformis*. **Pest Management Science**, Malden, v.72, n.9, p.1673-80, 2016.

PAUL, A. *et al.* Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v.43, n.1, p.55-60, 2006.

POSTON, D.H. *et al.* Enhanced sensitivity to cloransulam-methyl in imidazolinone-resistant smooth pigweed. **Weed Science**, Champaign, v.49, n.6, p.711–716, 2001.

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

RAGHAVENDRA, K. *et al.* Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. **Malaria Journal**, London, v.10, 16, 2011.

RIAR, D. S. *et al.* Physiological and Molecular Basis of Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicide Resistance in Barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n.2, p. 278-289, 2013.

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

SCOTT, J.G. *et al.* Insecticide Resistant Strains of House Flies (*Musca domestica*) Show Limited Cross-Resistance to Chlorfenapyr. **Journal of Pesticide Science**, Chichester, v.29, n.2, p.124-126, 2004.

SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, New York, v.2012, n. 217037, p.1-26, 2012.

TENBROOK, P.L.; TJEERDEMA, R.S. Biotransformation of clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.85, n.1, p.38-45, 2006.

WERCK-REICHHART, D. *et al.* Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.5, n.3, p.116–123, 2000.

YASUOR, H. *et al.* Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. **Pest Management Science**, Malden, v.64, n.10, p.1031-1039, 2008.

YASUOR, H. Differential oxidative metabolism and 5-ketoclomazone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clomazone. **Plant Physiology**, Rockville, v.153, n.1, p.319–326, 2010.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

A ocorrência de capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS e ao quinclorac apresentam ampla distribuição nas lavouras orizícolas. Atualmente herbicidas inibidores da enzima ACCase possuem grande importância para o controle de populações resistentes. Neste trabalho, foi identificado um biótipo com resistência ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl associado ao protetor isoxadifen-ethyl. Contudo, a resistência não foi verificada quando esse herbicida foi aplicado sem a presença do protetor. Não foi caracterizada a ocorrência de resistência-cruzada aos herbicidas haloxyfop-p-methyl, clodinafop-propargyl, cyhalofop-butyl, clethodim, sethoxydim, quizalofop-p-ethyl e fluazifop-p-butyl. A indução da resistência pela presença do protetor ocorreu apenas no biótipo resistente e não teve efeito no biótipo suscetível, indicando que o este possui um aparato enzimático de metabolização responsivo ao protetor que favorece a detoxificação do herbicida fenoxaprop. As enzimas GST apresentam papel importante nessa resistência, pois o isoxadifen-ethyl é um indutor dessas enzimas e a aplicação prévia de 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan, um inibidor de GST, reduziu o fator de resistência.

A ocorrência de resistência múltipla aos herbicidas quinclorac e imazethapyr também foi caracterizada no biótipo que apresentou resistência ao fenoxaprop-p-ethyl. As enzimas P450 não estão envolvidas no mecanismo de resistência de ambos herbicidas, pois não reduziram os fatores de resistência das variáveis. Para o herbicida quinclorac o inibidor de enzimas GST também não apresentou efeito, enquanto para o imazethapyr a variável massa seca apresentou redução do fator de resistência. A identificação de resistência múltipla a três

dos principais mecanismos de ação amplamente utilizados para controle de capim-arroz limita as ferramentas para o manejo químico dessa planta daninha e indica a necessidade de utilização de herbicidas de outros mecanismos de ação e de procedimentos de manejo integrado de plantas daninhas.

O uso de herbicidas pré-emergentes é uma ferramenta para o manejo da resistência, visto que diminuem a quantidade de plantas que serão expostas à pressão de seleção herbicida aplicada em pós-emergência, e uniformizam o estágio das plantas daninhas para a aplicação. O clomazone é herbicida pré-emergente classificado como pró-herbicida, pois necessita de ativação metabólica na planta para ter efeito herbicida. Essa bioativação é mediada pela ação de enzimas P450, também responsáveis por conferir resistência aos herbicidas inibidores da ALS em capim-arroz. Neste estudo foi verificado que biótipos com esse mecanismo de resistência apresentam resistência cruzada-negativa (RCN) ao herbicida clomazone. A aplicação de malathion, que age como inibidor de enzimas P450, foi eficiente em reverter este fenômeno. Assim, a ocorrência de RCN está associada à maior ativação do pró-herbicida clomazone pelas enzimas P450. A comparação de vários biótipos resistentes com mais de um suscetível indica que a ocorrência deste fenômeno não é ao acaso e está relacionada ao mecanismo de incremento de metabolização. A identificação da ocorrência de RCN vem sendo recentemente apontada como uma forma de prevenção a evolução de resistência a herbicidas. O uso de associação ou rotação de herbicidas com RCN pode ser capaz de prevenir, retardar ou suprimir o surgimento de populações de plantas daninhas resistentes em áreas com alta pressão de seleção.

A ocorrência da resistência a herbicidas em capim arroz apresenta casos crescentes de complexidade devido à existência de resistência múltipla, participação de incremento de detoxificação como mecanismo de resistência, ocorrência de resistência cruzada negativa e efeito de protetores na evolução da resistência. Esses processos indicam do ponto de vista científico a necessidade de realização de estudos mais completos a fim de promover um

maior entendimento sobre a variabilidade existente e dos processos fisiológicos causadores da resistência. Do ponto de vista tecnológico, fica evidenciada a necessidade de planejamento da utilização de herbicidas em relação à prevenção da ocorrência da resistência aos herbicidas e de uso de métodos alternativos de controle de plantas daninhas.

## 7 VITA

Luan Cutti é filho de Gilberto Cutti e Vandair Carmen Cutti, agricultores, nascido em Anta Gorda no dia 04 de agosto de 1993. Em 2010 concluiu o ensino médio no ESI – Colégio Santa Teresinha, na cidade natal. Em 2011 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria, campus Frederico Westphalen (UFSM/CESNORS). No período de agosto/2013 a julho/2014 foi contemplado com bolsa de graduação sanduíche pelo Programa Ciência sem Fronteiras, cursando dois semestres na Universidade de Bologna (Itália). Durante o período de intercâmbio cursou oito disciplinas nos diferentes departamentos da universidade, e realizou estágio curricular no Laboratorio di Ricerca e Analisi Sementi (LaRAS-UNIBO), sob supervisão do Prof<sup>o</sup> Dr. Enrico Noli. Durante toda a graduação no Brasil realizou iniciação científica na área de herbologia, iniciando já no primeiro semestre, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Pinto Lamego, e posteriormente do Prof<sup>o</sup> Dr. Diecson Ruy Orsolin da Silva. Ainda durante a graduação, dez/2014 a mar/2015 realizou estágio extra-curricular na Embrapa Soja, no setor de entomologia agrícola, sob supervisão do Dr. Samuel Roggia, e julho/2015 estágio extra-curricular em vendas e assistência técnica a produtores rurais na empresa AgriCenter – Frederico Westphalen. Formou-se Engenheiro Agrônomo em janeiro/2016. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em março/2016, com bolsa CAPES e sob orientação do Prof. Dr. Aldo Merotto Junior.