

# ATIVIDADE DA ACETOLACTATO SINTASE DE PLANTAS DE MILHO E DE AMENDOIM-BRAVO (*Euphorbia heterophylla*) RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO IMAZAQUIN<sup>1</sup>

*ALS Activity of Wild Poinsettia (Euphorbia heterophylla) and Corn (Zea mays) Resistant and Susceptible to Imazaquin*

OLIVEIRA, M.F.<sup>2</sup>, PRATES, H.T.<sup>3</sup>, BRIGHENTI, A.M.<sup>4</sup>, GAZZIERO, D.L.P.<sup>3</sup>, VIDAL, R.A.<sup>5</sup>, VARGAS, L.<sup>6</sup>, OLIVEIRA Jr., R.S.<sup>7</sup> e PURCINO, A.A.C.<sup>2</sup>

**RESUMO** - O amendoim-bravo, (*Euphorbia heterophylla*) é uma importante planta daninha em mais de 56 países, inclusive no Brasil, onde tem sido relatado o aparecimento de populações resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS). O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do herbicida imazaquin na atividade da ALS extraída das plantas de milho e amendoim-bravo, resistentes e suscetíveis ao produto. Sementes de dois genótipos de milho e vários biótipos de amendoim-bravo provenientes de diferentes regiões agrícolas brasileiras foram cultivadas em casa de vegetação por 21 dias. A atividade da ALS extraída das folhas das plantas foi determinada na presença de doses de imazaquin. A etapa de purificação da enzima foi substituída por uma centrifugação de 2.800 rpm por dois minutos. Equações de regressão linear para absorvância em função do log da concentração de imazaquin foram ajustadas para cada população, visando obtenção do  $I_{50}$ . A dose de imazaquin necessária para inibir 50% da atividade da ALS ( $I_{50}$ ) na variedade de milho Pioneer 3162 IR ( $I_{50}$  260  $\mu$ M) foi 4.333 vezes maior que a dose requerida pela BRS 473 (0,06  $\mu$ M), a qual é suscetível ao imazaquin. Os biótipos de amendoim-bravo provenientes do Rio Grande do Sul apresentaram valores de  $I_{50}$  de 1.961,3 e 13,8  $\mu$ M para os biótipos resistentes e suscetíveis, respectivamente. Os biótipos provenientes de Cafelândia e Maringá (PR) e Viçosa (MG) apresentaram valores de  $I_{50}$  maiores que 5.000  $\mu$ M para os biótipos resistentes e maiores que 1.000  $\mu$ M para os suscetíveis. O amendoim-bravo coletado na Embrapa Milho e Sorgo, em área que nunca foi tratada com herbicidas inibidores da ALS, apresentou  $I_{50}$  de 12,2  $\mu$ M. Conclui-se que a medida *in vitro* da atividade da ALS é um método sensível para determinação da presença de biótipos resistentes à ação do herbicida imazaquin. A etapa de purificação da ALS pode ser substituída por um método que envolve uma rápida centrifugação.

**Palavras-chave:** resistência a herbicida, ALS, soja, milho.

**ABSTRACT** - Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) is an important weed in more than 56 countries, including Brazil, where resistant biotypes to ALS inhibiting herbicides have been reported in soybean crops. The objectives of this research were to evaluate the effect of imazaquin on the activity of the acetolactate synthase (ALS), extracted from two corn varieties and several biotypes of *E. heterophylla* from Brazilian agricultural areas. Plants were grown under greenhouse conditions for 21 days. The ALS activity of wild poinsettia has shown resistance to imazaquin herbicide in soybean crops. *In vitro* acetolactate synthase (ALS) activity of imazaquin-resistant wild poinsettia collected in different soybean production areas from Brazil and the two corn populations was compared to that of imazaquin-sensitive populations. The activity of the ALS extracted from the leaves was measured with different imazaquin rates. The ALS purification

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 18/10/2001 e na forma revisada em 15/3/2002.

<sup>2</sup> Pesquisador Recém-Doutor do CNPq na Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 65, Caixa Postal 151, 35701-901 Sete Lagoas-MG, <moliveira@purdue.edu>; <sup>3</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo. <sup>4</sup> Pesquisador, Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, 86001-970 Londrina-PR. <sup>5</sup> Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 776, 90001-970 Porto Alegre-RS. <sup>6</sup> Doutorando, Dep. de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, 36570-001 Viçosa-MG.

<sup>7</sup> Professor, Universidade Estadual do Maringá, Av. Colombo, Maringá-PR.



process was substituted by centrifugation at 2800 rpm during two minutes. Linear regression equation for specific light length absorbance as a function of the log concentration of imazaquin was built to obtain  $I_{50}$  value (50% inhibition of the enzyme activity). The  $I_{50}$  values of Pioneer 3162 IR ( $I_{50}$  260  $\mu\text{M}$ ) corn genotype were 4,333 times higher than BRS 473-sensitive (0,06  $\mu\text{M}$ ). The wild poinsettia biotypes from the state of Rio Grande do Sul had  $I_{50}$  values of 1,961.3  $\mu\text{M}$  and 13.8  $\mu\text{M}$  for the resistant and sensitive biotypes, respectively. The resistant populations from Cafelândia, Maringá (PR) and Viçosa (MG) had  $I_{50}$  values higher than 5,000  $\mu\text{M}$ , while the sensitive population had values higher than 1,000  $\mu\text{M}$ . The  $I_{50}$  value for the wild poinsettia population collected from fields that had never been sprayed with imazaquin was of 12.2  $\mu\text{M}$ . Therefore, the *in vitro* ALS activity was a sensitive method to detect wild poinsettia-resistant imazaquin and ALS purification can be substituted for a method involving a quick centrifugation process.

**Key words:** herbicide resistance, ALS, soybean, corn.

## INTRODUÇÃO

Uma das vantagens do cultivo de milho resistente ao herbicida imazaquin é evitar os resíduos desse herbicida aplicados na cultura da soja em sucessão, além de viabilizar a pulverização deste produto na cultura. No entanto, a aplicação continuada desse ingrediente ativo numa mesma área de cultivo aumenta a pressão de seleção sobre as plantas daninhas e pode ainda selecionar microrganismos do solo especializados na sua degradação.

A aplicação repetida de mesmo ingrediente ativo numa mesma área, associada à grande diversidade biológica das espécies e à alta pressão de seleção dos produtos, especialmente os que possuem alta persistência no solo, tem levado ao aparecimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Esse problema tem se agravado nos últimos anos devido à grande especificidade do sítio de ação dos produtos (Harrison & Loux, 1995; HRAC/WSSA, 1999).

O aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas depende de características relacionadas às plantas daninhas, ao herbicida e ao manejo da cultura. A seleção para resistência é favorecida pela utilização de diferentes produtos com mesmo mecanismo de ação em diversas culturas cultivadas em rotação (Vidal & Merotto Jr., 1999).

A resistência aos herbicidas foi documentada em 1996, no Brasil, com biótipos de *Bidens pilosa* resistentes aos inibidores de ALS (Ponchio et al., 1996). Em 1997, Gazziero et al. identificaram biótipos de *Brachiaria plantaginea* resistentes aos gramínicos aplicados na

cultura da soja, e Vidal & Fleck (1997) documentaram a existência de três espécies daninhas brasileiras com resistência aos herbicidas: *Bidens* sp. e *Euphorbia heterophylla*, resistentes aos inibidores de ALS e *Brachiaria plantaginea*, resistente aos inibidores de ACCase.

Os herbicidas pertencentes ao grupo químico das sulfoniluréias e imidazolinonas reduzem o crescimento das plantas, por inibirem a atividade da acetolactato sintase, enzima-chave na rota biossintética dos aminoácidos de cadeia ramificada, como valina, leucina e isoleucina (Devine et al., 1993; Hess, 1994). Diversos autores têm descrito que essa enzima é lábil, apresentando-se como isoenzima em diferentes plantas daninhas e cultivadas. A resistência de plantas aos herbicidas inibidores de ALS tem sido estudada por diversos autores, visando tanto o manejo de plantas daninhas (Boutsalis & Powles, 1995; Sivakumaran et al., 1993) quanto a obtenção de plantas transgênicas (Sebastian et al., 1989; Saunders et al., 1992; Tonnemaker et al., 1992; Wright & Penner, 1998).

Estudos de resistência a herbicidas realizados *in vitro* com ALS por diversos autores (Wright & Penner, 1998; Vargas et al., 1999) têm sido realizados com as etapas de extração e purificação da enzima. Para o processo de purificação, esses autores descrevem a precipitação salina e a eluição da enzima em colunas cromatográficas, o que torna o processo mais longo e trabalhoso. A utilização de metodologia de extração e purificação da ALS menos laboriosa e mais rápida pode facilitar o uso desta técnica como método de diagnóstico de resistência a herbicidas.

Logo, além do conhecimento do espectro de controle de plantas daninhas pelo imazaquin e de seu comportamento no ambiente, o conhecimento da tolerância diferencial e/ou resistência das plantas daninhas aos herbicidas torna-se informação fundamental para utilização mais racional desse herbicida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do imazaquin na atividade da ALS em genótipos de milho e plantas de amendoim-bravo resistentes e suscetíveis ao produto, visando utilizá-lo como um método de diagnóstico precoce de resistência a esse herbicida.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de milho Pioneer 3162 IR (resistente a imazaquin) e BRS 473 (susceptível) e de biótipos de amendoim-bravo resistentes e suscetíveis selecionadas pelas Universidades Federais do Rio Grande do Sul (UFRGS) e de Viçosa (UFV), bem como sementes coletadas em lavouras de soja tratadas ou não com imazaquin provenientes de Central dos Jesuítas, município de Cafelândia-PR, da Estação Experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, foram cultivadas em casa de vegetação. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com três repetições. Vinte e um dias após a germinação, as folhas foram coletadas, postas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do ensaio enzimático. A atividade da ALS foi determinada pelo protocolo descrito por Wright & Penner (1998).

Preliminarmente, determinou-se o tempo de ensaio utilizado na primeira incubação, quando a ALS converte o substrato piruvato em acetolactato. Nesse ensaio, a mistura extrato mais tampão de reação (sem imazaquin e com  $5\ \mu\text{M}$  do herbicida) foi incubada a  $35^{\circ}\text{C}$  em diferentes tempos de reação. Os tempos de reação estudados foram: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min.

A extração da ALS consistiu da maceração de 1 g de folha de leiteiro (previamente congelado com nitrogênio líquido) com 4 mL (1:4 p/v) do tampão de extração (100 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5; 1 mM de piruvato de sódio; 0,6 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM de pirofosfato de tiamina;  $10\ \mu\text{M}$  de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); 10%

por volume de glicerol; e 2,0 g de polivinil-polipirrolidona (PVPP) a  $4^{\circ}\text{C}$ . A mistura foi centrifugada a  $17.000\ \text{xg}/20\ \text{min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante recolhido. A reação da enzima com o substrato foi obtida misturando 0,2 mL do extrato em 1,3 mL do tampão de reação (25 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,9; 0,625 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 25 mM de piruvato de sódio; 0,625 mM de pirofosfato de tiamina; e  $10\ \mu\text{M}$  de FAD) contendo doses crescentes de imazaquin: 0; 0,005; 0,05; 0,5; 5; 50; 500; e  $5.000\ \mu\text{M}$  para as plantas resistentes e 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; e  $1.000\ \mu\text{M}$  para as suscetíveis ou de resistência desconhecida. Após incubação por uma hora a  $35^{\circ}\text{C}$ , a reação foi finalizada adicionando-se  $50\ \mu\text{L}$  de 6 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e incubando-se a mistura a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Para desenvolvimento de cor, adicionaram-se 0,5 mL de creatina (0,5% p/v) e 0,5 mL de  $\alpha$ -naftol (5% p/v em NaOH 2,5 N), incubando-se novamente a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Após centrifugar a 2.800 rpm por dois minutos à temperatura ambiente, determinou-se a absorbância a 530 nm. Neste trabalho, não se utilizaram os processos de precipitação salina e eluição da enzima em colunas de cromatografia, descritos por Wright & Penner (1998) e Vargas et al. (1999).

O bioensaio conteve dois tratamentos-padrão sem o herbicida, denominados nulo e 100% de atividade. O primeiro recebeu  $50\ \mu\text{L}$  de 6 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  no início do bioensaio, antes da adição do tampão de reação, e o segundo não recebeu inibidor (100% de atividade da ALS). Em todos os ensaios, os valores de absorbância foram corrigidos por meio de subtração do valor do controle zero.

Equações de regressão para absorbância, em função do log da concentração de imazaquin, foram ajustadas para cada população, visando a obtenção do  $I_{50}$ , ou seja, a concentração de imazaquin necessária para inibir 50% da atividade da ALS.

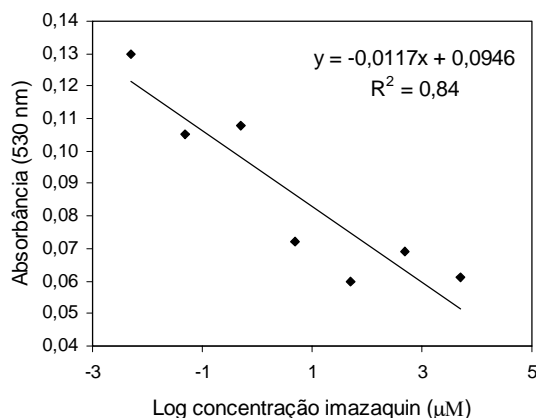
## RESULTADOS E DISCUSSAO

O tempo utilizado nos ensaios com ALS foi estabelecido por meio da curva de tempo de reação, na qual se determina a formação do produto em função do tempo. A atividade da ALS de milho foi crescente e linear até 240 min de reação, tanto na presença quanto na ausência do herbicida. Resultados similares foram



obtidos por Vargas et al. (1999), os quais verificaram que a atividade da ALS de amendoim-bravo apresentou-se linear até 90 min de incubação. Esses resultados demonstraram que o tempo de reação de 60 min é suficiente para a condução dos ensaios.

A Figura 1 ilustra a atividade de ALS de milho Pioneer, em diferentes concentrações de imazaquin. O aumento da concentração de imazaquin reduziu a atividade da ALS do milho e do leiteiro, independentemente do local de coleta e da resistência das populações. A sensibilidade do milho e do amendoim-bravo ao imazaquin foi variável entre as populações resistentes e suscetíveis (Tabela 1).



**Figura 1** - Valores de absorvância da atividade de ALS na variedade de milho Pioneer 3162 IR, em diferentes concentrações de imazaquin.

O valor de  $I_{50}$  para a ALS do milho resistente (Pioneer) foi 4.333 vezes maior que para o milho sensível (BRS) ao imazaquin (Tabela 1). O híbrido de milho Pioneer IR apresentou valor de  $I_{50}$  próximo do valor obtido por Wright & Penner (1998), que totalizou valor de 200 µM para o híbrido de milho isogênico 3751 resistente ao imazaquin, também da mesma companhia. Apesar de esses autores terem utilizado híbrido diferente e purificado parcialmente a enzima ALS antes do bioensaio, os resultados obtidos foram similares. As etapas de não-purificação parcial da enzima diminuem o número de operações no laboratório, facilitando a obtenção dos resultados, além de reduzir custos.

A população de amendoim-bravo proveniente da UFRGS apresentou nível de resistência 142 vezes maior que a população suscetível correspondente (Tabela 1). A população de amendoim-bravo coletada em Sete Lagoas apresentou valor médio de  $I_{50} = 12,22$  µM, similar ao obtido para a população suscetível proveniente da UFRGS. Vargas et al. (1999) observaram valores de  $I_{50}$  de 2,08 e 0,71 µM para a atividade de amendoim-bravo sensível ao imazapyr e imazethapyr, respectivamente. As populações de leiteiro resistente provenientes de Cafelândia (UEM) e de Viçosa foram cedidas pela Embrapa Soja e pela UFV, tendo sido selecionadas previamente por Gazziero et al. (1997, 1998) e Vargas et al. (1999), respectivamente. Esse fato explica o alto nível de resistência dessas populações ao imazaquin.

**Tabela 1** - Valores de  $I_{50}$  (µM) da atividade da ALS extraída de plantas de milho e amendoim-bravo

Rep.	Milho		Amendoim-bravo					
	Pioneer	BRS	UFRGS		Embrapa Soja		UFV	UEM
	R	S	R	S	R	S	R	S
1	200,9	0,064	1.907,5	5,4	> 5.000	> 1.000	> 5.000	> 1.000
2	300,3	0,097	1.832,9	18,5	> 5.000	> 1.000	> 5.000	> 1.000
3	278,6	0,029	2.143,4	17,8	> 5.000	> 1.000	> 5.000	> 1.000
Média	259,8	0,064	1.961,3	13,8	> 5.000	> 1.000	> 5.000	> 1.000
R/S	4,333		142					

R = resistente; S = suscetível.

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UFV = Universidade Federal de Viçosa; e UEM = Universidade Estadual de Maringá.



A aplicação do mesmo herbicida numa mesma área tem sido citada como fator de seleção de biótipos resistentes dentro da população (Radosevich et al., 1997). Além disso, produtos de maior persistência no solo aumentam a pressão de seleção exercida sobre a população de plantas daninhas (Christoffoleti et al., 1994; Radosevich et al., 1997). O alto valor de  $I_{50}$  obtido para a população de amendoim-bravo proveniente de Cafelândia, considerada suscetível, quando comparada com as outras populações suscetíveis, pode ser explicado pelo fato de ela ter sido amostrada em campos de soja onde o imazaquin havia sido aplicado algumas vezes anteriormente. A persistência do imazaquin de aproximadamente sete meses em solos tropicais (Rodrigues & Almeida, 1998) pode ter contribuído para a seleção de indivíduos resistentes nessa área.

A variabilidade da atividade da ALS na presença do imazaquin sugere que as diferentes populações possuem diferentes graus de resistência ao herbicida. Diante disso, boa estratégia para impedir a seleção de plantas de amendoim-bravo resistentes ao imazaquin seria o monitoramento periódico da população dessa planta daninha nos campos de cultivo e a rotação de produtos com mecanismos de ação diferenciados.

Trabalhos futuros que objetivaram a identificação de marcadores moleculares associados à resistência e/ou suscetibilidade do amendoim-bravo ao imazaquin podem ser de grande utilidade no monitoramento dessa planta daninha.

No entanto, o monitoramento periódico das populações de amendoim-bravo nos campos de cultivo e a rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação devem ser usados como procedimentos para evitar a seleção de populações de amendoim-bravo resistentes ao imazaquin.

Nas condições de condução do experimento, pode-se concluir que:

- A atividade da ALS é um método sensível para detecção de resistência do amendoim-bravo ao imazaquin.
- A etapa de purificação da enzima pode ser substituída por uma rápida centrifugação.

- A utilização de milho mutagênico resistente ao imazaquin poderá ser opção para evitar possíveis problemas de toxicidade em lavouros de milho-safrinha.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho; à Embrapa Milho e Sorgo, pela cessão das instalações; e a UFRGS, UEM, UFV, Embrapa Soja e BASF, pelo apoio técnico e científico.

## LITERATURA CITADA

- BOUTSALIS, P.; POWLES, S. B. Inheritance and mechanism of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Sonchus oleraceus* L. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 242-247, 1995.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTÓRIA FILHO, R.; SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.
- DEVINE, M.; DUKE, S.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. PTR - Prentice-Hall, 1993. 441 p.
- GAZZIERO, D. L. P. et al. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 16, n. 2, p. 117-125, 1998.
- GAZZIERO, D. L. P. et al. Resistência de biótipos de *Brachiaria plantaginea* aos inibidores da ACCase aplicados em soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21, 1997, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 1997. p. 88.
- HARRISON, S. K.; LOUX, M. M. Chemical weed management. In: SMITH, A. E. (Ed.) **Handbook of weed management systems**. New York: Deller Marcel, 1995. p. 101-154.
- HESS, D. **Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis**. In: INTENSIVE course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils, West Lafayette, Indiana, USA. West Lafayette: Purdue University. Departments of Horticulture, Agronomy, Botany and Plant Pathology, and Forestry and Natural Resources, 1994. p. 464-507.
- HERBICIDE HANDBOOK. **Weed science society of America**. Lawrence: 1998. 102 p.



HRAC/WSSA International Survey Of Herbicide-Resistant Weeds. Disponível: WSSA. URL: <http://www.weedscience.com>. Consultado: 01 march de 2001, (1999),16:00 PM.

PONCHIO, J. A. R. et al. ALS enzyme assay from *Bidens pilosa* biotypes of the Brazilian soybean areas to determine the sensitivity to imidazolinone and sulfonyleurea herbicides. In: MEETING OF THE WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 36, 1996, Norfolk. **Abstracts...** Champaign: Weed Science Society of America, 1996. p. 79.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. (Eds.) **Weed Ecology**: implications for management. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 589 p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 4.ed. Londrina: Edição do autor, 1998. 648 p.

SAUNDERS, J. W. et al. Monogenic dominant sulfonyleurea resistance in sugarbeet from somatic cell section. **Crop Sci.**, v. 32, p. 1357-1360, 1992.

SEBASTIAN, S. A. et al. Semidominant soybean mutation for resistance to sulfonyleurea herbicides. **Crop Sci.**, v. 29, p. 1403-1408, 1989.

SIVAKUMARAN, K. et al. Differential herbicide response among sulfonyleurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions. **Weed Sci.**, v. 41, p. 159-165, 1993.

TONNEMAKER, K. A. et al. Development of sulfonyleurea-resistant rapeseed using chemical mutagenesis. **Crop Sci.**, v. 32, p. 1387-1391, 1992.

VARGAS, L. et al. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 131 p.

VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. Three weed species with confirmed resistance to herbicides in Brazil. In: MEETING OF THE WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 37, 1997, Orlando. **Abstract...** Orlando: Weed Science Society of America, 1997. p. 100.

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 17, n. 3, p. 367-373, 1999.

WRIGHT, T. R.; PENNER, D. Corn (*Zea mays*) acetolactate synthase sensitivity to four classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Sci.**, v. 46, p. 8-12, 1998.