

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Cyperus difformis* L. RESISTENTE A PYRAZOSULFURON-ETHYL

**POLIDORO, Edimara¹, DAL MAGRO, Taísa¹, AGOSTINETTO, Dirceu¹, TAVARES
DE REZENDE, Sebastião², VARGAS, Leandro³, FALKOSKI, Daniel Luciano²**

¹Centro de Herbologia (CEHERB)-DFs/FAEM/UFPel, Campus Universitário – Caixa Postal 354 - CEP 96010-900. ²Universidade Federal de Viçosa. ³EMBRAPA Trigo.

INTRODUÇÃO

Os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), por apresentarem amplo espectro de controle de plantas daninhas, serem utilizados em baixas doses e apresentarem elevada seletividade às culturas (VIDAL & MEROTTO JR, 2001), representam o maior grupo de herbicidas em uso no mercado (DEVINE & SHUKLA, 2000).

O controle de plantas daninhas é realizado quase exclusivamente com herbicidas, o que acarretou aumento no número de casos de resistência, dentre elas, as resistentes a herbicidas inibidores de ALS, que representam cerca de 52% dos casos registrados mundialmente (HEAP, 2009).

A enzima ALS catalisa a descarboxilação da molécula de piruvato e sua condensação com a de piruvato ou α -cetobutirato. A primeira reação produz acetolactato (precursor da valina e leucina), e a segunda reação produz acetohidroxibutirato (precursor de isoleucina) (CHIPMAN et al., 1998). A inibição dessa enzima leva à falta desses aminoácidos essenciais à planta, causando a morte das mesmas.

Outros possíveis efeitos decorrentes de mutação na enzima ALS poderão ser alterações nas características cinéticas da enzima, como a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima (I_{50}). Estudos realizados para determinar o I_{50} , demonstraram que o biótipo resistente apresentou, em geral, valores superiores ao suscetível (LAMEGO, 2008; MEROTTO et al., 2007), sugerindo que a resistência é decorrente de alteração na sensibilidade da enzima pelo inibidor.

A hipótese dessa pesquisa é que o biótipo de *C. difformis*, resistente a herbicidas inibidores de ALS, não diferem do biótipo suscetível quanto às características cinéticas da ALS e que o mecanismo de resistência é decorrente da insensibilidade da enzima ao herbicida.

Assim, o objetivo da pesquisa foi determinar as bases bioquímicas da resistência de *C. difformis* a herbicidas inibidores da enzima ALS.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado experimento em laboratório no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO), pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Município de Viçosa – MG, no período de março a julho de 2008.

Para a obtenção do material vegetal foram utilizadas sementes de *C. difformis* resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da enzima ALS. A extração da enzima ALS foi realizada quando as plantas estavam com aproximadamente 15 cm de estatura. O método utilizado baseou-se na metodologia empregada por Carey et al., (1997) e adaptada por Vargas et al. (1999), com algumas modificações. Foram utilizadas 20g de material vegetal, congelado em nitrogênio líquido (N₂) e macerado em almofariz. Ao material, foi acrescido 80mL (1:4 p/v) do tampão de extração fosfato 100mM, com pH 7,5, a 4°C, contendo: 0,5mM de cloreto de magnésio; 1mM de piruvato de sódio; 0,5mM de tiamina pirofosfato (TPP); 10µM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); 10% v/v de glicerol; 1mM de ditioneitol; e, 5% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Posteriormente, o material foi homogeneizado lentamente e mantido sob agitação por 20 minutos a 4°C, sendo a mistura filtrada em gaze para remoção e descarte dos resíduos sólidos, e a fração líquida foi centrifugada a 13.500rpm por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o resíduo foi descartado.

Para o bioensaio foram preparadas reações em tubos de ensaio, onde cada tubo recebeu 600µL da solução enzimática, volumes variados da solução herbicida e volume de solução tampão para volume final de reação de 1mL. Foram preparadas duas soluções estoque do herbicida pyrazosulfuron-ethyl, a 5mM e 0,25mM, sendo que a partir dessas soluções foram calculadas as quantidades de herbicidas a serem adicionadas a cada tubo de ensaio. Para o biótipo suscetível as doses foram de 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 15; 25 e 50µM e para o biótipo resistente de 0; 25; 50; 100; 150; 250; 500; 750 e 1000µM. O bioensaio conteve dois tratamentos padrões sem o herbicida, denominados 0 (zero) e 100% (cem) de atividade, onde o primeiro recebeu 50µL de solução de H₂SO₄ 3M no início do bioensaio, antes da adição do piruvato (substrato), e o segundo foi o tratamento-padrão, testemunha sem inibidor. Os valores de absorvância desse tratamento foram descontados dos valores das leituras dos demais. Os resultados da atividade de cada tratamento constituem a média de três repetições.

Após o preparo da reação, iniciou-se o primeiro período de incubação, por 45 minutos a 30°C. Interrompeu-se a reação com adição de 50µL de solução de H₂SO₄ 3M em cada tubo de ensaio, exceto no controle zero, que já continha o ácido antes da incubação. A segunda incubação, por 15 minutos a 60°C, foi realizada para a formação da acetoína, a partir da reação do ácido sulfúrico com o acetolactato, formado durante a primeira reação.

Para a formação do complexo colorido foram adicionados 1mL de solução de creatina 0,5% p/v e 1mL de 1-naphtol 5% p/v, preparado em NaOH 2,5M no momento do uso. Após, a mistura foi novamente incubada por 15 minutos a 60°C, para o desenvolvimento da cor, que variou em tons de rosa claro a vermelho claro, contrastando com a cor marrom-esverdeada do padrão zero. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, e a absorvância lida em espectrofotômetro a 530nm.

Os valores referentes à atividade da enzima ALS foram apresentados por quantidade de acetoína produzida (µmol.min⁻¹.mL).

Os valores de absorvância foram corrigidos por meio da subtração do valor do controle zero. Os valores obtidos foram usados para calcular o I₅₀, o qual representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima, utilizando o modelo de regressão não linear (SEEFELDT et al., 1995), conforme segue:

$$y = \frac{a}{(1 + (x / xI_{50})^b)}$$

onde: y = atividade da enzima ALS (%); a = assíntota de máxima; x = dose do herbicida pyrazosulfuron-ethyl (μM); $x_{I_{50}}$ = dose do herbicida pyrazosulfuron-ethyl (μM) correspondente a 50% da inibição da enzima ALS; b = declividade da curva.

Foi determinado também, o fator de resistência (FR), o qual foi calculado pela divisão do I_{50} do biótipo resistente pelo correspondente ao do biótipo suscetível. O FR expressa o número de vezes em que a dose necessária para inibir 50% da atividade da enzima do biótipo resistente é superior a dose que inibe 50% do biótipo suscetível (HALL et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da enzima ALS, extraída de biótipos de *C. difformis* suscetível, foi inibida pelo herbicida pyrazosulfuron-ethyl, apresentando I_{50} de $0,57\mu\text{M}$ (Figura 1A). Entretanto, para o biótipo resistente, foram necessárias doses maiores do herbicida para ocorrer inibição, sendo o valor do I_{50} de $73,38\mu\text{M}$ (Figura 1B). Dessa forma, a dose de pyrazosulfuron-ethyl necessária para inibir 50% da atividade da enzima ALS do biótipo resistente foi 128,74 vezes a dose necessária para inibir a enzima ALS do biótipo suscetível (Tabela 1).

Diante dos resultados obtidos evidencia-se que a resistência apresentada pelo biótipo de *C. difformis* a pyrazosulfuron-ethyl foi, provavelmente, devido à insensibilidade da enzima ALS a esse herbicida e não é decorrente de super expressão da enzima ALS.

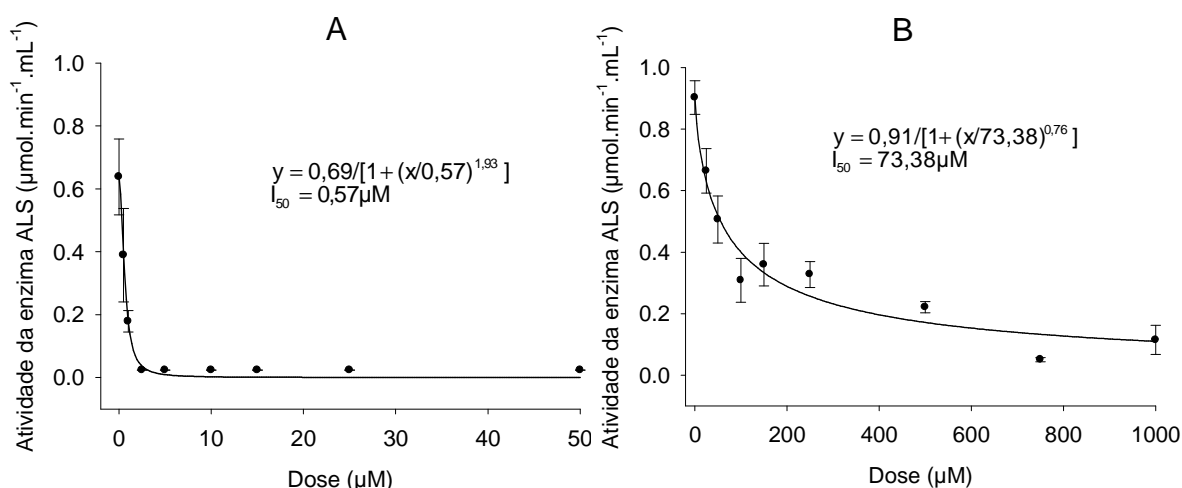


Figura 1 – Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) em biótipo de *C. difformis* suscetível (A) e resistente (B) a herbicidas inibidores da enzima ALS em função de doses de pyrazosulfuron-ethyl. UFV, Viçosa – MG, 2008.

Tabela 1 – Concentração do herbicida pyrazosulfuron-ethyl necessária para inibir 50% da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) (I_{50}) de *C. difformis* em biótipos resistente (R) e suscetível (S) e fator de resistência (FR). UFV, Viçosa – MG, 2008

Biótipos	I_{50} (μM) ¹
Resistente	73,38
Suscetível	0,57
FR ²	128,74

¹ Dados obtidos pela equação sigmoideal $y = a/(1 + (x/xa_{50})^b)$, ($p \leq 0,05$); ² Fator de resistência = I_{50R}/I_{50S} .

Elevado fator de resistência pode inviabilizar o controle de *C. difformis* com herbicidas inibidores de ALS, os quais se apresentam como o principal grupo de herbicidas recomendados para manejo da espécie (SOCIEDADE..., 2007). Entre os fatores responsáveis pelo aumento dos casos de resistência a este grupo de ação, encontram-se as características desses herbicidas, tais como utilização em baixas doses e alta seletividade às culturas (VIDAL & MEROTTO JR, 2001). Ainda, o aumento de casos de resistência pode ser decorrente do desenvolvimento de culturas resistentes a herbicidas inibidores de ALS, que resulta em acréscimo na pressão de seleção de espécies daninhas (DEVINE & SHUKLA, 2000). Medidas relacionadas à utilização ponderadas de manejo químico de plantas daninhas, tornam-se necessárias para prorrogar o surgimento da resistência.

CONCLUSÕES

A resistência de *C. difformis* ao pyrazosulfuron-ethyl decorre da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida.

A resistência de *C. difformis* ao herbicida pyrazosulfuron-ethyl é elevada inviabilizando o controle desta espécie por esse herbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAREY, J.B.; PENNER, D.; KELLS, J. Physiological basis for nicosulfuron and primisulfuron selectivity in five plant species. **Weed Science**, Champaign, v.45, n.1, p.22-30, 1997.
- CHIPMAN, D.; BARAK, Z.; SCHLOSS, J.V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxyacids: acetolactato synthase and acetohydroxyacid synthases. **Biochimica Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzimology**, Amsterdam, v.1385, n.2, p.401-419, 1998.
- DEVINE, M.D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, Oxford, v.19, n.8, p.881-889, 2000.
- HALL, L.M.; STROME, K.M.; MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C. Resistance to acetolactato sintase inhibithors and quinclorac in a biotypes of false clover (*Gallium sourium*). **Weed Science**, Champaign, v.46, n.4, p.390-396, 1998.
- HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em 8 jan. 2009.
- LAMEGO, F.P. **Elucidação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores de ALS na espécie poliplóide *Bidens subalternans* DC**. 2008. 152f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MEROTTO JR., A.; JASIENIUK, M.; FISCHER, A.J. Cross-resistance to ALS-inibiting herbicide groups and phylogenetic relationship of ALS gene in *Cyperus difformis* L.. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27., 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.280-283, 2007.
- SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, Champaign, v.9, n.2, p.218-227, 1995.
- SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO [SOSBAI]. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: Sosbai, 2007. 161p.

VARGAS, L.; SILVA, A.A.; BORÉM, A.; FERREIRA, F.A.; TAVARES, S.; SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 1 ed. Viçosa: JARD Prod. Gráficas Ltda, 1999, 131p.

VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. **Herbicidologia**. 1ed. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152p.