

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ELOUIZE XAVIER**

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E RESPOSTA AOS HERBICIDAS  
INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM *Euphorbia heterophylla* L.**

**DISSERTAÇÃO**

**PATO BRANCO**

**2014**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ELOUIZE XAVIER**

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E RESPOSTA AOS HERBICIDAS  
INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM *Euphorbia heterophylla* L.**

**DISSERTAÇÃO**

**PATO BRANCO**

**2014**

ELOUIZE XAVIER

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E RESPOSTA AOS HERBICIDAS  
INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM *Euphorbia heterophylla* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo M. Trezzi

Co-Orientador: Prof. Dr. Ribas Antonio Vidal

PATO BRANCO

2014

X3m      Xavier, Elouize.  
            Mecanismos de resistência e resposta aos herbicidas inibidores da ALS  
            e da PROTOX em *Euphorbia heterophylla* L. / Elouize Xavier. -- 2014.  
            211 f. : il. ; 30 cm.

            Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi  
            Coorientador: Prof. Dr. Ribas Antonio Vidal  
            Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
            Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2014.  
            Bibliografia: f. 178 – 199.

            1. Acetolactato sintase. 2. Protoporfirinogênio oxidase. 3. Leiteiro. 4.  
            Enzimas antioxidantes. I. Trezzi, Michelangelo Muzell, orient. II. Vidal,  
            Ribas Antonio, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
            Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Pato Branco  
Gerência de Ensino e Pesquisa  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**



## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 092

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E RESPOSTA AOS HERBICIDAS INIBIDORES  
DA ALS E DA PROTOX EM *Euphorbia heterophylla* L.**

por

ELOUIZE XAVIER

Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia vinte e cinco de fevereiro de 2014 como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas e Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

---

**Prof. Dr. Anderson Luis Nunes**  
Instituto Federal do RS/ Sertão

---

**Prof. Dr. Ribas Antonio Vidal**  
UTFPR/PB - UFRGS

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa de Cácia Oliveira**  
UTFPR/PB

---

**Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi**  
UTFPR/PB  
Orientador

Visto da Coordenação:

---

**Prof. Dr. Idalmir dos Santos**  
Coordenador do PPGAG

\* O termo de aprovação assinado encontra-se na coordenação do PPGAG

**Dedico este trabalho aos meus pais Orides Xavier e Leonice Maria Gnaotto Xavier.**

**Ao meu esposo Ederson Machado de Melo**

**E a todos que contribuíram para esta realização.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço a Deus pela vida e por tudo que sou.**

**Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Orides e Leonice pelo apoio, carinho e exemplos que são em minha vida.**

**Agradeço ao meu esposo Ederson, pelo amor, companheirismo, carinho, apoio, compreensão e ajuda nesta caminhada.**

**Agradeço ao meu orientador professor Michelangelo Muzell Trezzi pelo apoio, paciência, ensino, respeito e dedicação.**

**Agradeço ao meu co-orientador professor Ribas Antonio Vidal pelo apoio, respeito, colaboração e atenção.**

**Agradeço a minha co-orientadora professora Marisa de Cacia Oliveira pelo apoio, carinho, amizade, dedicação, paciência, colaboração e atenção.**

**Agradeço a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação.**

**Agradeço ao professor Dr. Anderson Luis Nunes pelo aceite do convite, pela disponibilidade e pelas contribuições para este trabalho.**

**Agradeço ao professor Dr. Leandro Galon, pela disponibilização do biótipo Vilhena, assim como pelo apoio, respeito, colaboração e atenção dada para a realização deste trabalho.**

**Agradeço a todos os servidores, em especial ao Sr. Otávio e ao Eloir, pela disposição e contribuição aos momentos que necessitei.**

**Agradeço aos meus colegas de pesquisa, Fortunato Pagnoncelli, Everton Scalcon, Álvaro Portes, Devair Rosin, Sorhaila Camila Batistel, Marcos Vinícius Jaeger Barancelli, Renato Pasini, Vinicius Bez Batti e Antonio Brusamarello pela amizade e pelo apoio nas minhas atividades.**

**Agradeço a todos os meus amigos de universidade que de uma forma ou outra contribuíram com suas amizades e colaboração para sempre seguir em frente.**

**Agradeço a todos os meus amigos pela amizade e companheirismo.**

**Agradeço aos integrantes do grupo de pesquisa de Plantas Daninhas, Francieli Diesel e Mateus Galon pelo apoio e amizade.**

**Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.**

**Assim, agradeço imensamente a todos, realmente todos, mesmo não citados, que de uma forma ou outra, apoiaram e auxiliaram na realização deste trabalho.**



*“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”*

Roberto Shinyashiki

## RESUMO

XAVIER, Elouize. Mecanismos de resistência e resposta aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX em *Euphorbia heterophylla* L. 211 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

*Euphorbia heterophylla* (EPHHL) é uma importante planta daninha na agricultura mundial, e a resistência aos herbicidas dificulta ainda mais o seu controle. Assim, conhecer o nível de resistência, os seus mecanismos e a persistência destas populações resistentes nas lavouras é fundamental para o estabelecimento de estratégias de prevenção e manejo. Foram realizados experimentos, objetivando estudar a resistência de EPHHL aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX nos níveis bioquímico, de planta e populacional. O capítulo I objetivou confirmar a ocorrência de resistência aos inibidores da ALS e determinar se existe resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos das imidazolinona, sulfoniluréia, pirimidil-benzoato e sulfonanilida em biótipos de EPHHL com resistência múltipla (ALS e PROTOX). O capítulo II objetivou confirmar a existência de novos biótipos de EPHHL com resistência a PROTOX nos estados do Paraná e Rondônia e determinar se existe resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos difeniléteres, ftalamida, triazolinona, oxadiazol e pirimidinedione. O capítulo III objetivou comparar a atividade da enzima ALS de biótipos com resistência múltipla com biótipo suscetível, na ausência e na presença dos herbicidas inibidores enzimáticos imazapyr, imazethapyr e nicosulfuron. O capítulo IV objetivou caracterizar as atividades das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase, em biótipos de EPHHL suscetível e com resistência múltipla, pela aplicação de herbicidas inibidores da PROTOX. E o capítulo V objetivou identificar a persistência de populações resistentes aos inibidores da ALS de EPHHL em lavouras da região Sudoeste e Oeste do Paraná que apresentavam resistência em levantamento prévio e verificar a existência de resistência de EPHHL ao glifosato nestas lavouras. Os resultados destes capítulos confirmaram que os biótipos de EPHHL Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira, com suspeita de resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, apresentam a resistência aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX e esta sendo cruzada aos 4 grupos químicos dos inibidores da ALS e aos 5 grupos químicos dos inibidores da PROTOX, testados. A resistência dos biótipos de EPHHL aos inibidores da ALS é atribuída à menor sensibilidade da enzima a estes herbicidas. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, peroxidase e catalase, para os biótipos resistentes e suscetível é dependente do herbicida e da dose utilizada e pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência aos inibidores da PROTOX. Os biótipos de EPHHL resistentes aos herbicidas inibidores da ALS permanecem nas áreas mesmo após longo período de constatação da resistência. Plantas de EPHHL com resistência aos inibidores da PROTOX também permanecem nas áreas, no entanto em menor frequência.

**Palavras-chave:** Acetolactato sintase. Protoporfirinogênio oxidase. Leiteiro. Resposta a dose. Enzimas antioxidantes. Levantamento.

## ABSTRACT

XAVIER, Elouize. Mechanisms of resistance and response to ALS and PROTOX inhibitors in *Euphorbia heterophylla* L. 211 f. Dissertation (Master's in Agronomy) – Program of post graduation in Agronomy (Field of study: Crop production), Federal University Technology of Paraná. Pato Branco, 2014.

*Euphorbia heterophylla* (EPHHL) is an important weed species in world agriculture and its control becomes difficult due to herbicide resistance. To develop proper EPHHL management strategies it is important to know the level and the mechanisms of resistance and persistence of resistant populations in the fields. Experiments were carried out to study the resistance of EPHHL to ALS and PROTOX inhibitors at biochemical, plant and population levels. The objectives on chapter I are to confirm the occurrence of resistance to ALS inhibitors and to determine whether there is cross resistance to other chemical groups, such as imidazolinone, sulfonylurea, pyrimidinyl (thio) benzoates and triazolopyrimidines in biotypes of EPHHL with multiple resistance (ALS and PROTOX). The objectives on chapter II are to confirm the existence of new EPHHL biotypes with resistance PROTOX in the states of Paraná and Rondônia and to determine whether there is cross resistance to other chemical group, such as diphenyl ethers, N-phenyl-phthalimide, triazolinone, oxadiazole and pyrimidinedione. The objectives on chapter III are to evaluate the activity of the ALS enzyme from biotypes with multiple resistance and to compare it to the enzyme activity of susceptible population in the absence and in the presence of the herbicides imazapyr, imazethapyr and nicosulfuron. The objectives on chapter IV is to characterize the activity of several antioxidant enzymes, such as peroxidase, catalase and superoxide dismutase in EPHHL biotypes treated with PROTOX-inhibiting herbicides. The objective on chapter V are to identify the persistence of EPHHL populations resistant to ALS inhibitors on fields from Southwest and Western Paraná that were resistant in a previous survey and check for resistance to glyphosate in EPHHL these crops. The results support the hypothesis that EPHHL biotypes from Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena and Medianeira have multiple resistance to ALS and PROTOX inhibitors. Four EPHHL biotypes are cross-resistant to all ALS chemical groups and five populations are cross-resistant to the PROTOX inhibitors tested. The resistance to ALS inhibitors on the EPHHL biotypes evaluated is attributed to the lower sensitivity of the herbicide target enzyme. The activity of all antioxidant enzymes, both on the resistant and susceptible biotypes, is dependent of the herbicide and on the dose used and can be one of the mechanisms of resistance to PROTOX inhibitors. The biotypes of EPHHL resistant to ALS-inhibiting herbicides remain in the area even after long-term observation of resistance. The resistance to PROTOX inhibitors also remains in areas, but less frequently.

Keywords: Acetolactate synthase. Protoporphyrinogen oxidase. Wild poinsettia. Dose-response. Antioxidant enzymes. Survey.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Rota de detoxificação das EROs, com ação das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, peroxidase e catalase.....	28
Figura 1.2 - Mecanismo antioxidante da enzima superóxido dismutase, pela dismutação do radical superóxido.....	28
Figura 1.3 - Mecanismo antioxidante da enzima peroxidase, pela oxidação do peróxido de hidrogênio. ....	29
Figura 1.4 – Mecanismo antioxidante da enzima catalase, pela detoxificação de peróxido de hidrogênio.....	30
Figura 2.1 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Suscetível de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.2. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	42
Figura 2.2 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Medianeira de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.3. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	44
Figura 2.3 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Vilhena de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.4. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	46
Figura 2.4 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Bom Sucesso do Sul de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21(C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.5. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	48
Figura 2.5 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Vitorino de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21(C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.6. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	50
Figura 2.6 - Massa da parte aérea verde (MPAV) (A) e massa da parte aérea seca (MPAS) (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Suscetível, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.7. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	52
Figura 2.7 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Medianeira, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.8. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	53
Figura 2.8 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vilhena, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.9. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	55
Figura 2.9 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Bom Sucesso do Sul, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.10. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	57
Figura 2.10 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vitorino, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.11. UTFPR, Pato Branco- PR, 2014.....	59
Figura 3.1 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Suscetível de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.2. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	73
Figura 3.2 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Medianeira de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros	

	das equações na Tabela 3.3. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	75
Figura 3.3 -	Controle [100- Controle (%)]do biótipo Vilhena de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.4. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	77
Figura 3.4 -	Controle [100- Controle (%)]do biótipo Bom Sucesso do Sul de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.5. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	79
Figura 3.5 -	Controle [100- Controle (%)]do biótipo Vitorino de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.6. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	81
Figura 3.6 -	Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Suscetível, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.7. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	83
Figura 3.7 -	Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Medianeira, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.8. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	85
Figura 3.8 -	Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vilhena, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.9. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	87
Figura 3.9 -	Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Bom Sucesso do Sul, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.10. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	89
Figura 3.10 -	Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vitorino, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.11. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	91
Figura 3.11 -	% de pixels em relação à testemunha do biótipo Suscetível de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.12. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	95
Figura 3.12 -	% de pixels em relação à testemunha do biótipo Medianeira de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.13. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	97
Figura 3.13 -	% de pixels em relação à testemunha do biótipo Vilhena de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.14. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	99
Figura 3.14 -	% de pixels em relação à testemunha do biótipo Bom Sucesso do Sul de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.15. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	101
Figura 3.15 -	% de pixels em relação a testemunha do biótipo Vitorino de <i>Euphorbia heterophylla</i> em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.16. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	103
Figura 4.1 -	Atividade da enzima acetolactato sintase do biótipo Suscetível (A) e dos biótipos resistentes Vitorino (B), Bom Sucesso do Sul (C) e Medianeira (D) de <i>E. heterophylla</i> L., em função das diferentes concentrações de piruvato. $K_M$ = concentração de piruvato que fornece a metade da velocidade máxima de reação ou a afinidade da enzima pelo substrato, e	

	$V_{\text{máx}}$ = velocidade máxima da reação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	115
Figura 4.2	- Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de <i>E. heterophylla</i> L. do biótipo suscetível (A) e dos biótipos resistentes Vitorino (B), Bom Sucesso do Sul (C) e Medianeira (D), em função das doses crescentes dos herbicidas imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	117
Figura 5.1	- Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * A atividade média dos biótipos, antes da aplicação dos herbicidas.....	128
Figura 5.2	- Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), 24, 48 e 72 HAA de oxadiazon. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	130
Figura 5.3	- Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), 24, 48 e 72 HAA de carfentrazone. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	132
Figura 5.4	- Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), 24, 48 e 72 HAA de flumiclorac. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	134
Figura 5.5	- Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), 24, 48 e 72 HAA de fomesafen. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	136
Figura 5.6	- Atividade da enzima POD ( $\text{UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * A atividade média dos biótipos, antes da aplicação dos herbicidas. ....	141
Figura 5.7	- Atividade da enzima POD ( $\text{UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de carfentrazone. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	143
Figura 5.8	- Atividade da enzima POD ( $\text{UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de flumiclorac. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	145
Figura 5.9	- Atividade da enzima POD ( $\text{UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de oxadiazon. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	147
Figura 5.10	- Atividade da enzima POD ( $\text{UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de fomesafen. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a	

	5% de probabilidade.....	149
Figura 5.11	- Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	154
Figura 5.12	- Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de oxadiazon. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	155
Figura 5.13	- Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de carfentrazone. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	157
Figura 5.14	- Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de flumiclorac. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	158
Figura 5.15	- Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de fomesafen. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	160
Figura 6.1	- Mapa do Estado do Paraná, com a localização geográfica dos municípios amostrados em cinza. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	167

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Análise química do solo utilizado para semeadura dos biótipos de EPHHL nos ensaios de curvas de dose resposta. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	39
Tabela 2.2 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Suscetível aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. ....	43
Tabela 2.3 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Medianeira, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	45
Tabela 2.4 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Vilhena, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	47
Tabela 2.5 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Bom Sucesso do Sul, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	49
Tabela 2.6 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Vitorino, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	51
Tabela 2.7 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) para o biótipo Suscetível. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	53
Tabela 2.8 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Medianeira. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	54
Tabela 2.9 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas(g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vilhena. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. ....	56
Tabela 2.10 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas(g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Bom Sucesso do Sul. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	58
Tabela 2.11 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vitorino. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. ....	60
Tabela 3.1- Análise química do solo utilizado para semeadura dos biótipos de EPHHL nos ensaios de curvas de dose resposta. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	69
Tabela 3.2 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Suscetível aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. ....	74
Tabela 3.3 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Medianeira aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	76
Tabela 3.4 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Vilhena aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. ....	78
Tabela 3.5 - Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a.	



	ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Bom Sucesso do Sul aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	80
Tabela 3.6	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter 50% e 80% de controle (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) para o biótipo Vitorino aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	82
Tabela 3.7	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) do biótipo Suscetível. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	84
Tabela 3.8	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Medianeira. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	86
Tabela 3.9	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vilhena. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.	88
Tabela 3.10	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Bom Sucesso do Sul. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	90
Tabela 3.11	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR <sub>50</sub> e GR <sub>80</sub> ) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vitorino. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.	92
Tabela 3.12	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Suscetível aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	96
Tabela 3.13	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Medianeira aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	98
Tabela 3.14	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Vilhena aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	100
Tabela 3.15	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Bom Sucesso do Sul aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	102
Tabela 3.16	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha <sup>-1</sup> ), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C <sub>50</sub> ) e (C <sub>80</sub> ) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Vitorino aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	104
Tabela 3.17	- Correlação dos níveis de controle e de pixels, para os biótipos Suscetível, Medianeira, Vilhena, Bom Sucesso do Sul e Vitorino, aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	105
Tabela 4.1	- Parâmetros da equação logística <sup>1</sup> utilizada para determinar os níveis de imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron necessários para reduzir em 50% a atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) dos biótipos resistentes e suscetível de <i>E. heterophylla</i> (I <sub>50</sub> ), e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	118
Tabela 6.1	- Avaliação dos 18 biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> coletados na região Oeste e Sudoeste do Paraná, pela aplicação do herbicida inibidor da ALS. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	169
Tabela 6.2	- Avaliação dos 18 biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> coletados na região Oeste e Sudoeste do Paraná, pela aplicação do herbicida inibidor da PROTOX. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	172

Tabela 6.3 - Avaliação dos 18 biótipos de <i>Euphorbia heterophylla</i> coletados na região Oeste e Sudoeste do Paraná, pela aplicação do herbicida inibidor da EPSPS. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	173
---	-----

## LISTA DE SIGLAS

UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
PR	Unidade da Federação – Paraná
RO	Unidade da Federação – Rondônia
BASF	Badische Anilin Und Soda-Fabrik

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Acetolactato sintase
AHAS	Acetoidroxiácido sintase
EPHHL	<i>Euphorbia heterophylla</i>
PROTOX	Protoporfirinogênio oxidase
R	Resistente
S	Suscetível
%	porcentagem
cm	Centímetro
DAA	Dias após aplicação
ha	Hectare
g ha <sup>-1</sup>	Gramas por hectare
i.a.	Ingrediente ativo
e.a.	Equivalente ácido
MPAV	Massa da parte aérea verde
MPAS	Massa da parte aérea seca
DMS	Diferença mínima significativa
rpm	Rotação por minuto
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimol
µM	Micromol
g	Gramas
mg	Miligramas
L	Litro
TPP	Tiamina pirofosfato
FAD	Flavina adenina dinucleotídeos
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
U/mg	Unidade por miligrama
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima
nm	Nanômetro
C <sub>50</sub>	Dose que proporciona 50% de controle
C <sub>80</sub>	Dose que proporciona 80% de controle
GR <sub>50</sub>	Dose que proporciona 50% de redução da MPAV e MPAS
GR <sub>80</sub>	Dose que proporciona 80% de redução da MPAV e MPAS
FR	Fator de resistência
HAA	Horas após aplicação
SOD	Superóxido simutase
POD	Peroxidase
CAT	Catalase
>	Maior que
<	Menor que

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>21</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E POTENCIAL COMPETITIVO DA ESPÉCIE <i>Euphorbia heterophylla</i> L.....	21
1.2 RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS.....	22
1.3 HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS.....	23
1.3.1 Resistência aos Herbicidas Inibidores da ALS.....	24
1.4 HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA PROTOX.....	25
1.4.1 Resistência aos Herbicidas Inibidores da PROTOX.....	26
1.4.2 Estresse Oxidativo.....	27
1.4.3 Enzimas Antioxidantes.....	28
1.4.3.1 Superóxido Dismutase.....	28
1.4.3.2 Peroxidase.....	29
1.4.3.3 Catalase.....	30
1.5 LEVANTAMENTO DE POPULAÇÕES RESISTENTES.....	30
1.6 HIPÓTESES.....	32
1.7 OBJETIVOS.....	32
1.7.1 Geral.....	32
1.7.2 Específicos.....	32
<b>2. CAPÍTULO I - RESPOSTA DE BIÓTIPOS DE <i>Euphorbia heterophylla</i> L. A DOSES DOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS.....</b>	<b>34</b>
2.1 RESUMO.....	34
2.1 ABSTRACT.....	35
2.2 INTRODUÇÃO.....	36
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.3.1 Avaliações e Análises Estatísticas.....	40
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
2.4.1 Controle.....	41
2.4.2 Massa da Parte Aérea Verde e Massa da Parte Aérea Seca.....	51
2.5 CONCLUSÕES.....	62
<b>3. CAPÍTULO II - RESPOSTA DE BIÓTIPOS DE <i>Euphorbia heterophylla</i> L. A DOSES DE HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX.....</b>	<b>64</b>
3.1 RESUMO.....	64
3.2 ABSTRACT.....	65
3.3 INTRODUÇÃO.....	66
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
3.4.1 Avaliações e Análises Estatísticas.....	70
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.5.1 Controle.....	72
3.5.2 Massa da Parte Aérea Verde e Massa da Parte Aérea Seca.....	82
3.5.3 Análise de Imagens.....	94
3.6 CONCLUSÕES.....	108
<b>4. CAPÍTULO III- ATIVIDADE DA ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE EM <i>Euphorbia heterophylla</i> L. COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX.....</b>	<b>110</b>
4.1 RESUMO.....	110
4.2 ABSTRACT.....	110

4.3 INTRODUÇÃO.....	111
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	113
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	115
4.6 CONCLUSÕES.....	120
<b>5. CAPÍTULO IV - ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM BIÓTIPOS DE Euphorbia heterophylla L. COM RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA PROTOX</b>	<b>121</b>
5.1 RESUMO.....	121
5.2 ABSTRACT.....	121
5.3 INTRODUÇÃO.....	122
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	124
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
5.5.1 Superóxido dismutase (SOD).....	126
5.5.2 Peroxidase (POD).....	139
5.5.3 Catalase (CAT).....	152
5.6 CONCLUSÕES.....	162
<b>6. CAPÍTULO V – MONITORAMENTO DE BIÓTIPOS DE Euphorbia heterophylla L. COM RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA ALS EM ÁREAS ANTERIORMENTE DIAGNOSTICADAS NO OESTE E SUDOESTE DO PARANÁ.....</b>	<b>163</b>
6.1 RESUMO.....	163
6.2 ABSTRACT.....	163
6.3 INTRODUÇÃO.....	164
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	167
6.4.1 Coleta de Sementes e Aplicação de Questionário.....	167
6.4.2 Verificação da Resistência.....	168
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	168
6.6 CONCLUSÕES.....	174
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>175</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>178</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>201</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E POTENCIAL COMPETITIVO DA ESPÉCIE *Euphorbia heterophylla* L.

O leiteiro, amendoim-bravo, flor-de-poetas ou café do diabo é uma planta daninha da família Euphorbiaceae, espécie *Euphorbia heterophylla* L. (EPHHL). É nativa das regiões tropicais e subtropicais das Américas (CRONQUIST, 1981). A grande preocupação em relação a esta planta daninha, no meio agrícola ocorre devido a sua grande habilidade e capacidade competitiva com as culturas de lavoura. O seu ciclo anual é curto, sendo possível ocorrer de duas a três gerações em um ano. Apresenta rápido crescimento e multiplicação, com porte médio, variando entre 40 e 60 cm de altura (LORENZI, 2006). Seu desenvolvimento é adequado em variados tipos de solo, preferindo, no entanto, os férteis e bem drenados. A via fotossintética do leiteiro é C<sub>4</sub> (KISSMANN; GROTH, 1992). Se reproduz via sementes, que são produzidas em abundância, até 3000 sementes por planta, que apresentam baixa dormência, características que contribuem grandemente para a sua capacidade competitiva com as culturas comerciais. O seu sistema de reprodução ocorre predominantemente por autofecundação, mas há um percentual de fecundação cruzada (CRONQUIST, 1981).

A EPHHL está presente em 74% das áreas de soja na região do Planalto do estado do Rio Grande do Sul (BIANCHI, 1996). Estudos relatam que EPHHL é considerada uma das espécies com maior capacidade de competição na cultura da soja, com grandes prejuízos às culturas comerciais (VOLL et al., 2002). Essa espécie pode reduzir a produtividade de grãos da cultura da soja em até 80% (KISSMANN; GROTH, 1992). Em densidades de 12 e 52 plantas por metro quadrado (plantas m<sup>-2</sup>) de EPHHL convivendo com a soja por 115 dias, reduziram o rendimento em 22% e 50%, respectivamente (CHEMALE; FLECK, 1982). Foram constatadas reduções de 30% na produtividade da soja, devido à infestação de 42,5 plantas m<sup>-2</sup> de EPHHL (KARAM et al., 1993). A presença de EPHHL na cultura soja reduziu seu acúmulo de matéria seca (RIZZARDI et al., 2004a). A soja mantida em convivência com EPHHL, até o florescimento, tem o seu crescimento e acúmulo de macronutrientes reduzidos (CARVALHO et al., 2010). A convivência de plantas de EPHHL com a soja após 17 dias após a emergência (DAE) resultou numa perda de

produtividade diária de grãos de 5,15 kg ha<sup>-1</sup>, e para cada dia de ausência de EPHHL na cultura da soja, houve ganho diário de produtividade de 7,27 kg ha<sup>-1</sup> (MESCHEDE et al., 2002). A interferência de EPHHL na soja entre 11 e 68 DAE provocou uma perda diária na produtividade de 6,45 kg ha<sup>-1</sup> e durante todo o ciclo a perda foi de 38% (MESCHEDE et al., 2004).

## 1.2 RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é definida como a capacidade de uma planta sobreviver e se reproduzir após exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biótipo selvagem da planta (WEED SCIENCE, 2013). Esta resistência surge como uma resposta evolutiva destas plantas às práticas agrícolas empregadas (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2001). O primeiro caso de resistência aos herbicidas em plantas daninhas foi relatado por volta de 1957 (HILTON, 1957; SWITZER, 1957) e nas duas últimas décadas, tem se tornado um grande problema mundial (MENNE; KOCHER, 2007; YAMASHITA; GUIMARÃES, 2011).

No mundo, atualmente, existem 221 espécies resistentes aos herbicidas (R), sendo 129 dicotiledôneas e 92 monocotiledôneas. As plantas daninhas desenvolveram resistência a 22 dos 25 mecanismos de ação dos herbicidas que são conhecidos e a 152 herbicidas diferentes, em 79 culturas de 63 países (HEAP, 2014). O mecanismo de ação que apresenta o maior número de casos de resistência aos herbicidas no mundo é dos inibidores da ALS, com 143 espécies registradas, seguido dos inibidores do FSII, da ACCase e das auxinas sintéticas, com 72, 44 e 31 espécies, respectivamente (HEAP, 2014).

Os principais fatores que influenciam a resistência estão relacionados a características das plantas daninhas, dos herbicidas e de práticas culturais (WINKLER et al., 2002). Os principais mecanismos que conferem resistência às plantas daninhas são absorção diferencial do herbicida, a translocação diferencial, a compartimentalização, a metabolização, alteração do sítio de ação e a superprodução do sítio de ação (DEKKER; DUKE, 1995; VIDAL; MEROTTO Jr., 2001).

A resistência pode ser cruzada ou múltipla. A resistência cruzada ocorre quando biótipos de plantas daninhas são resistentes aos herbicidas de



grupos químicos distintos, pertencentes ao mesmo mecanismo de ação. Já a resistência múltipla ocorre quando o biótipo de planta daninha é resistente aos herbicidas de dois ou mais mecanismos de ação. Assim a dificuldade de controle das plantas daninhas com herbicidas apresentaria a seguinte ordem: resistência simples < resistência cruzada < resistência múltipla (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Mundialmente, tem havido aumento significativo dos casos de resistência múltipla. Isto é preocupante, pois representa uma ameaça ainda maior, que casos de resistência simples, pois limita ainda mais as opções de controle (TREZZI et al., 2006). A resistência surge pelo uso inadequado e repetitivo dos herbicidas. Assim, neste contexto, existe a necessidade de rotação de mecanismos de ação para o controle das plantas daninhas. No entanto, quando o herbicida alternativo para controle de plantas daninhas já resistentes é utilizado de forma repetitiva, o processo seletivo sobre a população prossegue, aumentando significativamente a probabilidade da ocorrência de resistência múltipla. Portanto, há necessidade de rotacionar sistemas de produção e herbicidas, e de utilizar outras estratégias de manejo, além do controle químico.

Dentre as consequências principais da resistência de plantas daninhas aos herbicidas pode-se citar a restrição ou inviabilização da utilização desses produtos, perdas de áreas de plantio, rendimento e qualidade dos produtos das culturas agrícolas, necessidade de reaplicação de herbicidas, mudanças no sistema de produção e, em alguns casos, requerendo aumento de doses dos herbicidas, que tem como consequência maior impacto ambiental e elevação dos custos de produção, com consequente redução da competitividade na comercialização do produto final (CHRISTOFFOLETI et al., 2008; TREZZI et al., 2009 a). A grande preocupação decorre, também, do aumento nos custos de controle de plantas daninhas resistentes, principalmente em razão do limitado, ou em alguns casos, inexistente número de herbicidas alternativos para o controle dos biótipos resistentes.

### 1.3 HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS

Os herbicidas pertencentes ao mecanismo de ação dos inibidores da ALS agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS) (E.C. 2.2.1.6), também

conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS), que catalisa a condensação de dois piruvatos para formar o acetolactato, ou de um piruvato com 2-cetobutirato para produzir acetoidroxibutirato na rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (HESS, 1994), limitando a síntese proteica, e assim interferindo na síntese do DNA e no crescimento celular (OLIVEIRA Jr., 2001). Ocorre inibição não competitiva dos herbicidas com o substrato, resultando no bloqueio da reação na formação dos aminoácidos (NICOLAI et al., 2008).

A utilização dos herbicidas inibidores da ALS deve-se a sua baixa toxicidade a animais, à elevada seletividade para praticamente todas as culturas, grande gama de plantas daninhas controladas e, principalmente, pela sua alta eficiência de controle mesmo em doses baixas (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001; TREZZI; VIDAL, 2001). Os herbicidas inibidores da ALS pertencem a cinco grupos químicos: sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidiloxitobenzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinones (HRAC, 2010).

### 1.3.1 Resistência aos Herbicidas Inibidores da ALS

No Brasil, atualmente, biótipos resistentes aos inibidores da ALS são documentados em *Amaranthus viridis*, *Amaranthus retroflexus*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Cyperus difformis*, *Conyza sumatrensis*, *Euphorbia heterophylla*, *Echinochloa crus-galli*, *Fimbristylis miliacea*, *Lolium multiflorum*, *Oryza sativa*, *Parthenium hysterophorus*, *Raphanus sativus* e *Sagittaria montevidensis* (HEAP, 2014). No mundo, existem 143 espécies com resistência a estes herbicidas, configurando o mecanismo de ação com maior número de casos de resistência. Em 1982, poucos anos após o início do uso desses herbicidas, surgiu a primeira espécie resistente aos inibidores da ALS, o *Lolium rigidum*, na Austrália, que apresentava resistência a mais de um mecanismo de ação (HEAP, 2014). Até hoje, no mundo, existem três registros de EPHHL resistentes aos inibidores de ALS. Porém, quando se considera todos os mecanismos de ação, este número cresce para quatro registros, cabendo ressaltar que em um destes casos ocorre resistência múltipla aos inibidores de ALS/PROTOX (HEAP, 2014).

O surgimento de resistência em plantas daninhas a esse mecanismo de ação se deve a vários motivos. Primeiramente, ao excessivo emprego dos herbicidas, nas mais diversas culturas, e também ao seu uso repetitivo; além disso,

muitos dos herbicidas inibidores da ALS apresentam residual prolongado no solo e, conseqüentemente, aumentam a pressão de seleção para biótipos resistentes; a alta frequência inicial de biótipos resistentes devido a características genéticas. Em geral, a adaptabilidade ecológica dos biótipos suscetíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da ALS é similar, garantindo a produção de sementes dos escapes das pulverizações. A maioria dos casos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS estudada apresenta resistência cruzada aos diversos grupos químicos de herbicidas deste mecanismo de ação (TRANEL; WRIGHT, 2002). Na literatura mundial, observam-se vários casos de mutações da ALS que originaram resistência aos herbicidas inibidores desta enzima em plantas daninhas. Mutações nas posições Ala 122, Pro 197, Ala 205, Asp 376, Arg 377, Trp 574, Ser 653 e Gly 654, da enzima ALS são encontradas em biótipos de muitas espécies daninhas resistentes (TRANEL et al., 2013).

#### 1.4 HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA PROTOX

Os herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), são eficazes em baixas doses, são rapidamente degradados no ambiente e têm amplo espectro de controle de plantas daninhas (DUKE et al., 1991; SCALLA; MATRINGE, 1994). No mundo, existem oito grupos químicos de herbicidas inibidores da PROTOX que são registrados para o controle de plantas daninhas em culturas agrícolas: difeniléteres, fenilpirazol, ftalamidas, tiadiazoles, oxadiazoles, triazolinonas, oxazolidinedionas e pirimidinedionas. No entanto, existem outros cujo grupo ainda não foi denominado (HRAC, 2010). Entretanto, no Brasil estão registrados, atualmente, apenas cinco grupos químicos: difeniléteres, ftalamidas, oxadiazoles, triazolinonas e pirimidinedionas.

A enzima PROTOX está presente na rota da síntese da clorofila e de citocromos, também chamada de rota da síntese de porfirinas ou de tetrapirroles (MEROTTO Jr.; VIDAL, 2001). Esta enzima localiza-se nos cloroplastos e mitocôndrias (HA et al., 2003), sendo responsável por catalisar a etapa de oxidação do protoporfirinogênio-IX a protoporfirina-IX na via de biossíntese das clorofilas e citocromos (FERREIRA, 2007). A ação dos herbicidas inibidores da PROTOX ocorre pela competição entre o herbicida e o substrato (protoporfirinogênio IX). Os herbicidas inibidores da PROTOX possuem maior afinidade com a enzima do que o substrato,

que se acumula no cloroplasto e difunde-se para o citoplasma, onde é rapidamente oxidado a protoporfirina IX (MEROTTO Jr.; VIDAL, 2001). Para que possam manifestar a ação herbicida, deve haver o acúmulo de protoporfirina IX no citoplasma e disponibilidade de luz (LI et al., 2004). Na presença de luz e oxigênio, protoporfirina IX gera oxigênio singleto, que causa peroxidação da membrana celular e, conseqüentemente, necrose dos tecidos e morte das plantas (DAYAN; DUKE, 2010). Portanto, o efeito primário da inibição da enzima PROTOX é a geração de estresse oxidativo (DEVINE et al., 1993).

#### 1.4.1 Resistência aos Herbicidas Inibidores da PROTOX

No mundo, atualmente, estão identificados apenas onze biótipos com resistência aos inibidores da PROTOX, pertencentes a seis espécies daninhas: *Acalypha australis*, *Amaranthus quitensis*, *A. tuberculatus* (syn. *Rudis*), *Ambrosia artemisiifolia*, *Descurainia sophia* e *Euphorbia heterophylla* (HEAP, 2014). No Brasil, existe apenas um caso de resistência a este mecanismo de ação, na espécie EPHHL, detectado na região Sudoeste do Paraná, no ano de 2004 (TREZZI et al., 2005), sendo este caso de resistência, o terceiro relato mundial de resistência aos inibidores da PROTOX.

Dos onze biótipos relatados com resistência aos inibidores da PROTOX, sete apresentam resistência múltipla e todos têm como característica comum à resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX (HEAP, 2014). O primeiro registro de resistência ocorreu em 2001 no estado do Kansas, em biótipo de *A. tuberculatus* (sinonímia = *rudis*) resistente aos inibidores da ALS e da PROTOX. Os relatos mais recentes de resistência aos inibidores da PROTOX, ocorreram em 2011, na China, com biótipos de *Acalypha australis* e *Descurainia sophia*, com resistência apenas aos inibidores da PROTOX (HEAP, 2014).

Tanto a tolerância quanto a resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX, em diversas espécies, ocorre através de vários mecanismos, como a mínima translocação, associada à rápida metabolização (EASTIN, 1971), alteração do local alvo (DAYAN; DUKE, 1997), alta concentração da enzima glutathione-S-transferase (FREAR; SWANSON, 1973), rápida metabolização (DAYAN et al., 1997), aumento da concentração da enzima PROTOX nas mitocôndrias (WARABI et al., 2001), mutação em gene nuclear (PATZOLDT et al. 2006), super expressão de

genes responsáveis pela geração da enzima PROTOX (II JUNG; KUK, 2007).

#### 1.4.2 Estresse Oxidativo

Alguns mecanismos de ação herbicida são capazes de gerar estresse oxidativo nas plantas, levando à inibição do seu desenvolvimento e até a morte. O estresse oxidativo em plantas causa danos às células através da produção de radicais livres ou espécies reativas do oxigênio (EROs) (MORI; SCHROEDER, 2004). Os herbicidas inibidores da PROTOX matam ou suprimem o desenvolvimento das plantas através da geração de estresse oxidativo, com o acúmulo de radicais livres (DAYAN; WATSON, 2011).

O estresse oxidativo resulta de uma superprodução de EROs, tais como radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) que são capazes de causar mudanças estruturais e funcionais em lipídios como a peroxidação lipídica nas membranas, em proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos (SCANDALIOS, 1993; THÉRON et al., 2000), e outros danos irreversíveis nos componentes fotossintéticos (SHAALTIEL; GRESSEL, 1986; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Todas as EROs apresentam elevada capacidade reativas e são extremamente citotóxicas. O  $OH^{\cdot}$  e o  $^1O_2$  são tão reativos que suas produções devem ser minimizadas rapidamente. O  $OH^{\cdot}$  tem um grande potencial oxidativo atacando rapidamente e sem discriminação qualquer macromolécula, levando a sérios danos celulares, com disfunções metabólicas irreparáveis e até morte celular (SCANDALIOS; ACEVEDO; RUZSA, 2000). Quando comparado aos outros radicais, o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$  são, em geral, pouco reativos, no entanto, quando na presença de íons metálicos como o Fe, podem ativar uma sequência de reações para a formação de  $OH^{\cdot}$  (BOWLER et al., 1992).

As plantas possuem sistemas de defesa contra os estresses ambientais que envolvem a formação de EROs, entre eles, os antioxidantes lipossolúveis associados às membranas, como  $\alpha$ - tocoferol e  $\beta$ -caroteno, os redutores hidrossolúveis, como o tripeptídeo glutathiona (GSH) e o ascorbato, e as enzimas antioxidantes (Figura 1.1) , tais como superóxido dismutase (SODs, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (PODs, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e

glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2) (ELSTNER, 1982; FERREIRA, 2007). Estes mecanismos permitem minimizar os danos que podem ocorrer pela ação das EROs (RADETSKI et al., 2000).

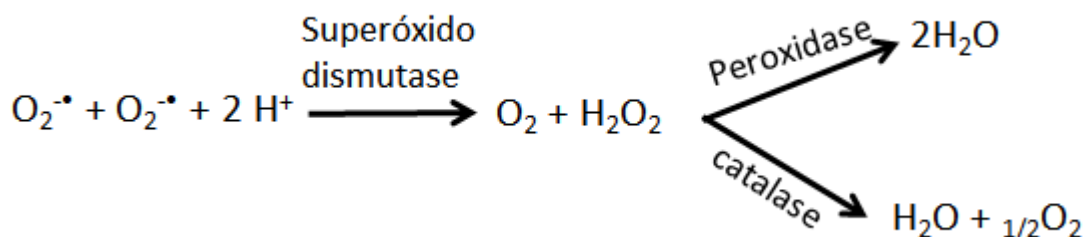


Figura 1.1 – Rota de detoxificação das EROs, com ação das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, peroxidase e catalase.

O aumento dos níveis EROs pode ser influenciado por vários fatores como a radiação UV, luminosidade intensa, herbicidas, ataque de patógenos, certas injúrias, ozônio, flutuações na temperatura, extremos de temperatura, seca, metais pesados, concentração elevada de sais, poluição do ar, etc. (SCANDALIOS, 1993; MALLICK; MOHN, 2000).

### 1.4.3 Enzimas Antioxidantes

#### 1.4.3.1 Superóxido Dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é um componente de defesa que os organismos aeróbicos desenvolveram para proteção contra o estresse oxidativo (CATANEO et al., 2005). As SODs desempenham papel chave no sistema de defesa antioxidante através da dismutação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (Figura 1.2). As SODs são metaloenzimas que ocorrem em três diferentes formas moleculares, contendo os metais Mn, Fe ou Cu/Zn como grupos prostéticos (FRIDOVICH, 1986).

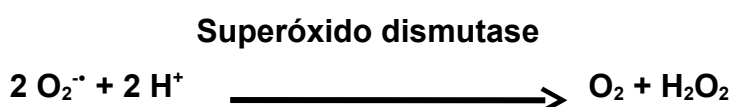


Figura 1.2 - Mecanismo antioxidante da enzima superóxido dismutase, pela dismutação do radical superóxido.

A SOD tem sua atividade induzida sob condições de estresse oxidativo, como uma resposta para metabolizar os radicais  $O_2^{\cdot-}$  produzidos (CATANEO et al., 2005). As plantas aumentam a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, para limitar a peroxidação de lipídios produzida pelos radicais  $O_2^{\cdot-}$ . A atividade da enzima SOD, pode ser utilizada como indicador de estresse oxidativo causado pela aplicação de herbicidas, havendo correlação entre o estresse oxidativo gerado por herbicidas, e a atividade da SOD (DODGE, 1971; MATTERS; SCANDALIOS, 1986; MALAN; GREYLING; GRESSEL, 1990; PASTORI; TRIPPI,1992; KRAUS; FLETCHER, 1994; CATANEO et al., 2005).

#### 1.4.3.2 Peroxidase

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) são enzimas capazes de catalisar a oxidação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 1.3) (GROPPIA et al, 1999), constituindo-se uma forma de proteção antioxidativa (ROSSI, et al.,1997).

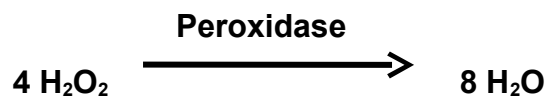


Figura 1.3 - Mecanismo antioxidante da enzima peroxidase, pela oxidação do peróxido de hidrogênio.

A atividade da peroxidase pode aumentar em plantas que foram submetidas a diversos tipos de estresse. Muitas vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado, biótico ou abiótico (SIEGEL, 1993; LIMA et al., 1999), como estresse oxidativo em condição de estresse salino (MITTAL; DUBEY, 1991; SAHU; MISHRA,1987; LIMA et al., 1999; ROSSI et al.,1997), estresse hídrico (JADOSKI et al., 2005), em condição de exposição a metais pesados (GASPAR et al., 1985; MARKKOLA et al.,1990; ROSSI; LIMA, 2001) e por ataque de patógenos (MOHAN; KOLATTUKUDY, 1990; ARAÚJO et al., 2008). Esta enzima também pode ser utilizada com indicador de estresse oxidativo em condição de aplicação de herbicidas (WANG; ZHOU, 2006; JIANG; YANG, 2009; SAVIC et al., 2010). A eficiência do sistema antioxidante, ao lado de outros mecanismos fisiológicos, aumenta a capacidade de tolerância da planta, devido à diminuição dos efeitos causados pelas EROs (GIANNAKOULA et al., 2010).

### 1.4.3.3 Catalase

As enzimas denominadas de catalases (CAT, EC 1.11.1.6) são componentes de defesa antioxidante primários e exercem duas funções importantes: a detoxificação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formando água e oxigênio (Figura 1.4); e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol e fenóis (AEBI, 1984). A CAT desempenha um papel importante na quebra de  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado pela fotorrespiração, e se expressa facilmente nas folhas dos vegetais, protegendo, assim, as células do efeito nocivo do acúmulo do superóxido (KROHLING, 2010).

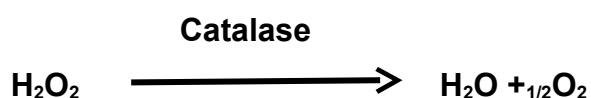


Figura 1.4 – Mecanismo antioxidante da enzima catalase, pela detoxificação de peróxido de hidrogênio.

A atividade das catalases é importante para o monitoramento, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse oxidativo (LAM et al. 1995; CHANDRAN et al., 2005; AVILEZ et al., 2008). Esta enzima também pode ser utilizada com indicador de estresse oxidativo causado pela aplicação de herbicidas (KENYON; DUKE, 1985; IVANOV et al., 2002; SINGH et al., 2010; SINGH et al., 2013).

## 1.5 LEVANTAMENTO DE POPULAÇÕES RESISTENTES

O manejo químico empregado inadequadamente, sem a rotação de mecanismos de ação e pelo emprego repetitivo de um mesmo herbicida, aumenta a probabilidade de aparecimento de casos de resistência em regiões agrícolas, o que traz sérios problemas para a agricultura.

Desde meados da década de 1980, o controle de plantas daninhas dicotiledôneas, como a EPHHL em soja foi obtido, principalmente, pela aplicação dos herbicidas inibidores da ALS (VIDAL et al., 2004), sendo que elevada eficácia no controle de plantas daninhas dicotiledôneas e a época de aplicação flexível, permitiram que esses produtos se tornassem os principais herbicidas na cultura da soja (HERNANDES et al., 2005).



No Brasil, o primeiro caso de resistência registrado ocorreu no ano de 1993 com biótipo de *Bidens pilosa* resistente (R) aos inibidores da ALS (CHRISTOFFOLETI; VICTÓRIA FILHO; MONQUERO, 1997). Atualmente, no Brasil existem 31 casos de resistência registrados, sendo que, 19 destes apresentam resistência simples ou múltipla aos inibidores da ALS (HEAP, 2014). A literatura brasileira demonstra que desde a década de 1990 foram detectados biótipos de EPHHL R aos herbicidas inibidores da ALS (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL; MEROTTO Jr., 1999; VIDAL et al., 2004; WINKLER; VIDAL, 2004; TREZZI et al., 2005) e *Bidens pilosa* (HERNANDES et al., 2005).

No estado do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, principalmente, o uso de herbicidas inibidores da ALS se estendeu até iniciar a adoção, por parte dos agricultores, das cultivares de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato, no final da década de 90. O emprego de monoculturas em áreas agrícolas favorece o crescimento do banco de sementes de plantas daninhas tolerantes e resistentes, isto pelo controle ineficaz dos herbicidas que frequentemente foram utilizados (OWEN, 2001). Nos estados do Sul do Brasil, a adoção massiva de herbicidas inibidores da ALS, por muitos anos, proporcionou o surgimento de bancos de sementes muito elevados dos biótipos de EPHHL R a este mecanismo de ação. Pouca atenção tem sido dispensada a situação atual dos bancos de sementes de EPHHL R, após anos de adoção de cultivares de soja resistente ao glifosato. Os bancos de sementes são dinâmicos e a viabilidade das sementes presentes nos mesmos depende de diversos fatores, tais como as culturas estabelecidas, as práticas de manejo adotadas e a eficiência dos métodos de manejo de plantas daninhas, os quais irão contribuir com a entrada de novos propágulos e a saída dos mesmos do banco (LACERDA, 2003).

É importante conhecer a situação atual dos bancos de sementes de plantas daninhas R aos inibidores da ALS. Primeiramente, porque com o surgimento de biótipos de *Conyza* spp. R ao glifosato nas áreas de soja do Sul do Brasil (YAMAUTI et al., 2010; DAN et al., 2013), o uso de herbicidas inibidores da ALS passou a ser, novamente, uma prática constante nas lavouras. Em segundo lugar, pela expectativa de lançamento de cultivares de soja geneticamente modificada para resistência aos inibidores da ALS o que proporcionaria a intensificação do uso dos mesmos nas lavouras.

Assim, há necessidade de mais estudos sobre a identificação do estado

atual da resistência aos inibidores da ALS, e principalmente em lavoura da região Oeste e Sudoeste do Paraná com históricos de resistência, para que sejam fornecidas mais informações aos agricultores e profissionais sobre o comportamento da resistência a ALS durante anos de emprego dos manejos culturais nas propriedades agrícolas.

## 1.6 HIPÓTESES

As hipóteses são:

- 1) Biótipos distintos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX apresentam resultados distintos quanto à resistência cruzada;
- 2) A atividade da enzima ALS em biótipo de *E. heterophylla* suscetível é mais afetada pela ação de herbicidas inibidores da ALS do que em biótipos com resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX;
- 3) A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, peroxidase e catalase em biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla é superior à atividade destas enzimas em biótipo suscetível;
- 4) A população ativa de *E. heterophylla* resistente aos inibidores da ALS é persistente e se mantém por muitos anos nas áreas de lavoura.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Geral

Estudar a resistência de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX aos níveis bioquímico, de planta e populacional.

### 1.7.2 Específicos

- Determinar os níveis de controle de biótipos de *E. heterophylla* suscetível e resistentes, através de curvas de dose resposta e determinar os fatores de resistência (FR's) aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX;

- Investigar a existência de resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos dos inibidores da ALS e da PROTOX em biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla;
- Verificar se os métodos de cálculo do  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  através dos softwares SigmaPlot 10.0 e Excel podem ser empregados para o cálculo desses parâmetros;
- Determinar se a análise de imagens através de software ImageJ apresenta boa correlação com técnicas convencionais de avaliação da resposta de herbicidas para a espécie *E. heterophylla*;
- Caracterizar a atividade enzimática da enzima ALS em biótipos suscetível e resistentes;
- Caracterizar a atividade das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase, em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e com resistência múltipla;
- Verificar a persistência do caráter resistência aos inibidores da ALS e da PROTOX em bancos de sementes de *E. heterophylla* de lavouras da região Sudoeste e Oeste do Paraná que apresentavam resistência em levantamento prévio;

## 2. CAPÍTULO I - RESPOSTA DE BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L. A DOSES DOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS

### 2.1 RESUMO

O uso repetitivo de herbicidas exerce forte pressão de seleção em áreas agrícolas, favorecendo o surgimento de espécies daninhas resistentes aos mesmos. Atualmente estão registradas 221 espécies daninhas resistentes no mundo. Biótipos de *Euphorbia heterophylla* (EPHHL) com resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX foram detectadas no estado do Paraná. Assim, objetivou-se com este trabalho: (1) confirmar a ocorrência de resistência aos inibidores da ALS em biótipos de EPHHL com resistência múltipla (ALS e PROTOX) originários dos estados do Paraná e Rondônia; (2) determinar a existência de resistência cruzada aos inibidores da ALS dos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas, nestes biótipos; (3) determinar os níveis de resistência nos biótipos suspeitos, por meio do cálculo dos fatores de resistência (FR). Foram realizados dois experimentos simultaneamente, em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo o primeiro de resposta à dose em biótipo suscetível (S), em esquema fatorial 4x7, sendo quatro herbicidas inibidores da ALS [imazethapyr (imidazolinonas), nicosulfuron (sulfoniluréias), pyriithiobac (pirimidil-benzoatos) e diclosulan (sulfonanilidas)] e sete proporções da dose comercial (x): 0x, 0,1x, 0,16x, 0,26x, 0,41x, 0,66x e 1x. O segundo experimento foi de resposta à dose em biótipos suspeitos de resistência, arranjado em fatorial 4 x 4 x 7, sendo o fator biótipos (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena), o fator herbicidas inibidores da ALS (os mesmos utilizados para o biótipo S) e sete proporções da dose comercial: 0x, 1x, 1,8x, 3,1x, 5,4x, 9,4x e 16,4x. Foram realizadas avaliações de controle visual, aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA). Aos 21 DAA, realizou-se a pesagem da massa da parte aérea verde (MPAV) e, posteriormente, massa da parte aérea seca (MPAS). Foram calculadas as doses de herbicidas para proporcionar 50% ( $C_{50}$ ) e 80% ( $C_{80}$ ) de controle e para reduzir 50% ( $GR_{50}$ ) e 80% ( $GR_{80}$ ) da matéria verde e seca, e os fatores de resistência (FR). Os  $C_{50}$ ,  $C_{80}$ ,  $GR_{50}$ ,  $GR_{80}$  e FR's foram distintos, variando de acordo com biótipo, herbicida e variável mensurada. Houve elevada correlação entre as estimativas de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  obtidas

através softwares SigmaPlot 10.0 e Excel, podendo ambos ser utilizados. Os quatro biótipos de EPHHL com suspeita de resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX apresentaram resistência aos herbicidas inibidores da ALS. Em ordem decrescente dos níveis de resistência, os biótipos podem ser classificados como: Bom Sucesso do Sul > Vilhena > Vitorino > Medianeira. Os quatro biótipos apresentaram resistência cruzada a todos os inibidores de ALS de todos os grupos químicos testados.

## 2.1 ABSTRACT

The frequent use of herbicides exerts a strong selection pressure on agricultural areas and endows the emergence of weed species resistant to the compounds. *Euphorbia heterophylla* (EPHHL) biotypes with multiple resistance (R) to ALS and PROTOX inhibitors were detected in the state of Paraná. This study aimed: (1) to confirm the occurrence of R to ALS inhibitors in biotypes of EPHHL with multiple R (ALS and PROTOX) from the states of Paraná and Rondônia; (2) to determine the existence of cross-resistance to ALS inhibitors from several chemical groups, such as imidazolinone, sulfonyleurea, pyrimidinyl (thio) benzoates and triazolopyrimidines, in these biotypes; (3) to determine the levels of herbicide R on the biotypes evaluated. Two experiments were carried out simultaneously, at the greenhouse, in a completely randomized design, with four replicates. The first experiment tested the herbicide dose response on a susceptible (S) biotype, using a 4x7 factorial. The factor A consisted of four ALS-inhibitors (imazethapyr (imidazolinone), nicosulfuron (sulfonyleurea), pyriithiobac (pyrimidinyl (thio) benzoates) and diclosulan (triazolopyrimidines)) sprayed at seven proportions of commercial dose (x): 0x, 0,1x, 0,16x, 0,26x 0,41x, 0,66x e 1x. The second experiment evaluated the herbicide dose response in biotypes suspected of R, arranged in a factorial design 4x4x7. The factor A consisted of the biotypes (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira and Vilhena), the factor B were the same ALS-inhibitors as in experiment 1, and the factor C were seven proportions of commercial dose: 0x, 1x, 1,8x, 3,1x, 5,4x, 9,4x e 16,4x. The herbicide effect was visually evaluated at 7, 14 and 21 days after application (DAA). At 21 DAA, it was evaluated the fresh-shoot mass (MPAV) and dry-shoot mass (MPAS). It was calculated the herbicides doses needed for 50% ( $C_{50}$ ) and 80% ( $C_{80}$ ) control and to reduce 50% ( $GR_{50}$ ) and 80% ( $GR_{80}$ ) of fresh and dry shoot mass. The resis-

tance factors (RF) was calculated from the R/S ratio of the former variables. The  $C_{50}$ ,  $C_{80}$ ,  $GR_{50}$ ,  $GR_{80}$  and RF's depended on the biotype, herbicide and variable measured. There was a high correlation between the estimates of  $C_{50}$  and  $GR_{50}$  obtained through software SigmaPlot 10.0 and Excel, which can both be used. The four EPHHL biotypes suspected of multiple resistance to ALS and PROTOX inhibitors were demonstrated to be R to ALS inhibitors. In decreasing order, the level of resistance Bom Sucesso do Sul > Vilhena > Vitorino > Medianeira. The four biotypes were cross resistant to all ALS inhibitors from all chemical groups tested.

## 2.2 INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas representou um grande avanço no manejo de plantas daninhas na agricultura (VIDAL et al., 2006), constituindo, atualmente, a base do seu controle (NORSWORTHY et al., 2012). Contudo, após anos consecutivos do uso desses produtos, deparou-se com o surgimento de muitos casos de resistência, chegando-se hoje a 221 espécies daninhas resistentes no mundo (HEAP, 2014).

Os inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) é o mecanismo de ação com maior número de casos de biótipos resistentes (R) a um único mecanismo de ação e também a mais de um mecanismo de ação no mundo (HEAP, 2014). ALS é a primeira enzima na via metabólica de biossíntese dos aminoácidos leucina, valina e isoleucina (RIZZARDI et al., 2002). As imidazolinonas, sulfoniluréias, sulfonanilidas e pirimidil-benzoatos são os principais grupos químicos que inibem essa enzima (LEITE et al., 1998). Este mecanismo apresenta o maior número de herbicidas registrados no mercado (DEVINE; SHUKLA, 2000) que ganharam popularidade devido ao amplo espectro de ação, baixas doses recomendadas, baixa toxicidade, e seletividade a várias culturas (MONQUERO et al., 2000; TREZZI; VIDAL, 2001; ROMAN et al., 2007).

A seleção de biótipos de plantas R aos herbicidas inibidores da ALS é um fenômeno crescente na maioria das regiões produtoras de soja no Brasil, devido ao uso repetitivo destes herbicidas. No Brasil, são relatados atualmente casos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em *Bidens pilosa*, *B. subalternans*, *Sagittaria montevidensis*, *Cyperus difformis*, *Fimbristylis miliacea*, *Raphanus sativus*,

*Echinochloa crus-galli*, *Lolium multiflorum*, *Conyza sumatrensis*, *Amaranthus retroflexus*, *A. viridis* e *Euphorbia heterophylla* (EPHHL) (HEAP, 2014).

A EPHHL é uma planta daninha que apresenta grande capacidade competitiva com as culturas comerciais (KISSMANN; GROTH, 1992). Desde os anos 90, os principais herbicidas seletivos utilizados para seu controle são os inibidores da ALS e da PROTOX (MEROTTO JR; VIDAL 2001), e isso permanece até os dias atuais.

A resistência de EPHHL aos inibidores da ALS foi detectada no Brasil e no Paraguai (HEAP, 2014). No estado do Paraná, populações de EPHHL R aos herbicidas inibidores de ALS estão amplamente distribuídas (WINKLER; VIDAL, 2004). No Sudoeste do Estado, Trezzi et al. (2005) identificaram dois biótipos de EPHHL com suspeitas de resistência, no ano de 2004. Ambos não eram controlados satisfatoriamente com os herbicidas imazethapyr (inibidor da ALS) e fomesafen (inibidor da PROTOX). Nos últimos anos, novos casos suspeitos de resistência de EPHHL a esses mecanismos foram relatados por agricultores deste estado e também no município de Vilhena (RO).

Os biótipos R aos inibidores da ALS, comumente apresentam resistência cruzada aos herbicidas pertencentes ao mesmo grupo químico com o qual o biótipo foi selecionado, mas possuem padrões diversos de resistência cruzada a outros grupos químicos de herbicidas inibidores da ALS. Biótipos de EPHHL R, apresentaram níveis variáveis de resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas e sulfoniluréias (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL; MEROTTO Jr., 1999; VARGAS et al., 1999).

A resistência aos herbicidas pode ser confirmada por vários métodos. Entretanto, para a caracterização inicial de um provável biótipo de planta daninha R, recomendam-se experimentos de resposta à dose sob condições controladas (câmara de crescimento, casa de vegetação, etc.) utilizando-se plantas inteiras (GAZZIERO et al., 2008), comparando-se curvas de resposta à dose entre biótipos com suspeita de resistência e biótipo suscetível (S) (RYAN, 1970). Com o ajuste das curvas de resposta à dose, podem-se calcular as doses responsáveis pela redução de 50% da variável dependente ( $GR_{50}$  e  $C_{50}$ ) dos biótipos R e S, o que permite quantificar o nível de resistência (SEEFELDT et al., 1995). Assim, é possível determinar os fatores de resistência (FR) das populações coletadas e determinar o

nível de resistência existente na população (VIDAL et al., 2007a; GAZZIERO et al., 2008).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram: confirmar a ocorrência de resistência aos inibidores da ALS em biótipos de EPHHL com resistência múltipla (ALS e PROTOX) originários dos estados do Paraná e Rondônia; determinar a ocorrência de resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas (inibidores da ALS) nestes biótipos; e determinar os níveis de resistência nos biótipos suspeitos, por meio do cálculo dos fatores de resistência.

### 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Câmpus Pato Branco, localizado a latitude 26°07'S e longitude 52°41'W. O clima é classificado como subtropical úmido (Cfa), e altitude média de 760 m. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Para este trabalho utilizaram-se biótipos de EPHHL suscetível (S) e com suspeita de resistência (R) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX e que estavam disponíveis no banco de sementes da instituição. Os biótipos utilizados foram denominados de Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira, Vilhena e Suscetível, sendo oriundos dos municípios de Bom Sucesso do Sul (Paraná), Vitorino (Paraná) e Medianeira (Paraná), Vilhena (Rondônia) e São Paulo (São Paulo), respectivamente.

Para os experimentos, as sementes inicialmente foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, por 5 minutos, e álcool a 50%, por 1 minuto. As sementes dos biótipos foram pré-germinadas em caixas gerbox, contendo papel germitest, em BOD e quando plântulas atingiram 3 a 5 cm foram transplantadas para vasos.

Nestes experimentos foram utilizados vasos com volume de 5 dm<sup>3</sup>, preenchidos com solo da Área Experimental da UTFPR, os quais foram peneirados e corrigidos nutricionalmente de acordo com os resultados da análise de solo (Tabela 2.1).



Tabela 2.1 - Análise química do solo utilizado para semeadura dos biótipos de EPHHL nos ensaios de curvas de dose resposta. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

<b>pH</b>	<b>Ca</b>	<b>Cl<sub>2</sub></b>	<b>MO</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al<sup>+3</sup></b>	<b>SB</b>	<b>V</b>
			gdm <sup>-3</sup>	mgdm <sup>-3</sup>			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			%
4,9			71,03	17,32	0,53	4,71	2,65	0,08	7,89	61,16

Os dois experimentos foram realizados simultaneamente, no período 23 de março a 30 de abril de 2013. Os herbicidas foram aplicados sobre plantas com duas folhas verdadeiras, utilizando pulverizador a pressão constante de CO<sub>2</sub>, com bicos leque 110.02 e volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. A aplicação dos herbicidas ocorreu no dia 09 de abril de 2013, e as condições ambientais no início e final das aplicações foram as seguintes: temperatura do ar = 18,6 a 23,5 °C; umidade relativa do ar = 73,5 a 61%.

No primeiro experimento utilizou-se um biótipo S de EPHHL, oriundo de São Paulo. Para a variável controle, os tratamentos foram arranjos em um fatorial 4 x 7, sendo o fator herbicidas inibidores da ALS [imazethapyr (imidazolinonas), nicosulfuron (sulfoniluréias), pyriithiobac (pirimidil-benzoatos) e diclosulan (sulfonanilidas)] e o fator concentrações dos herbicidas. As sete proporções da dose comercial (x) utilizada foram 0x, 0,1x, 0,16x, 0,26x, 0,41x, 0,66x e 1x, correspondentes às concentrações de 0, 10, 16, 26, 41, 66 e 100 g i.a. ha<sup>-1</sup> de imazethapyr; 0, 6, 10, 16, 25, 40 e 60 g i.a. ha<sup>-1</sup> de nicosulfuron, 0, 4, 6, 9, 14, 23 e 35 g i.a. ha<sup>-1</sup> de diclosulan e 0, 4, 7, 11, 17, 28 e 42 g i.a. ha<sup>-1</sup> de pyriithiobac.

O segundo experimento foi realizado com os biótipos de EPHHL com suspeita de R a ALS/PROTOX. Os tratamentos deste segundo experimento foram arranjos em fatorial 4 x 4 x 7, sendo, respectivamente, o fator biótipos (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena), o fator herbicidas inibidores da ALS (os mesmos utilizados no experimento com o biótipo S) e o fator concentrações dos herbicidas. Para este experimento, as sete proporções da dose comercial utilizadas para os inibidores de ALS foram 0x, 1x, 1,8x, 3,1x, 5,4x, 9,4x e 16,4x, correspondentes às concentrações de 0, 100, 180, 310, 540, 940 e 1640 g i.a. ha<sup>-1</sup> de imazethapyr, 0, 60, 108, 186, 324, 564 e 984 g i.a. ha<sup>-1</sup> de nicosulfuron, 0, 35, 63, 109, 189, 329 e 574 g i.a. ha<sup>-1</sup> de diclosulan, e 0, 42, 76, 130, 227, 395 e 689 g i.a. ha<sup>-1</sup> de pyriithiobac. Conforme recomendação para o pyriithiobac adicionou-se óleo mineral a 0,5% v/v. Aos demais herbicidas não foram adicionados adjuvantes, conforme a bula dos produtos comerciais.

### 2.3.1 Avaliações e Análises Estatísticas

Aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA), foram realizadas avaliações visuais do controle herbicida, através de uma escala de avaliação, em que 0% representa a ausência de controle e 100% a morte das plantas (FRANS et al.,1986).

Aos 21 DAA, foi determinada a massa da parte aérea verde (MPAV) imediatamente após a coleta das partes aéreas das plantas e, posteriormente, a massa da parte aérea seca (MPAS) após secagem em estufa a 60 °C, até atingir massa constante.

Os dados de controle encontrados foram transformados a partir da fórmula  $100 - \text{controle (\%)}$  e submetidos à análise da variância, pelo teste F ( $P < 0,05$ ). As relações entre variáveis dependentes e as concentrações de herbicidas foram ajustadas através do modelo de regressão não linear, empregando-se o modelo logístico de três parâmetros (Equação 1) com auxílio do programa computacional SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2010):

$$y = \frac{a}{1 + \text{abs}\left[\frac{x}{x_0}\right]^b} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $y$  = Variável dependente;  $a$  = assíntota máxima;  $x$  = concentração do herbicida;  $x_0$  = concentração que proporciona 50% de controle;  $b$  = declividade da curva.

Com os valores das médias calculou-se o erro padrão da média, através do quociente entre o desvio padrão e a raiz quadrada do tamanho da amostra.

Também foram calculadas as doses necessárias para proporcionar controle de 50 e 80% ( $C_{50}$  e  $C_{80}$ ) do controle e o ( $GR_{50}$  e  $GR_{80}$ ) de redução na MPAV e MPAS, através do programa Microsoft Excel. Os fatores de resistência (FR) foram calculados pelo quociente entre os  $C_{50}$  dos biótipos R e  $C_{50}$  do biótipo S.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o experimento com o biótipo S, houve significância da interação herbicida x dose para variável controle pela avaliação visual, em todas as épocas avaliadas e massa da parte aérea seca (MPAS). Para a variável massa da parte aérea verde (MPAV) houve significância de herbicida e dose.

Para o experimento com os biótipos R, os resultados de controle pela avaliação visual, para todas as épocas avaliadas, houve significância da interação biótipo x herbicida x dose. Para a MPAV houve significância para biótipo x herbicida e também efeito simples de dose. E para a variável MPAS houve significância das causas de variação biótipo e dose.

#### 2.4.1 Controle

Em ambos os experimentos observou-se aumento dos níveis de controle com o decorrer do tempo e com a elevação da dose dos herbicidas, com valores significativamente maiores para o biótipo S em relação ao R (Figuras 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5). Os níveis máximos de controle do biótipo S com a dose recomendada dos inibidores da ALS (1x), nos três períodos de avaliação (7, 14 e 21 DAA), foram 50% (nicosulfuron), 70% (pyrithiobac) e 100 % (pyrithiobac, diclosulan, nicosulfuron e imazethapyr), respectivamente (Figura 2.1, A, B e C).

A utilização da dose comercial (1x) dos quatro herbicidas permitiu confirmar a suscetibilidade do biótipo S aos inibidores da ALS. Níveis de controle aos 21 DAA superiores a 73% foram observados com o uso de 0,66 X, para todos os herbicidas, reforçando a condição de suscetibilidade do biótipo S aos grupos químicos testados neste experimento (Figura 2.1 C).

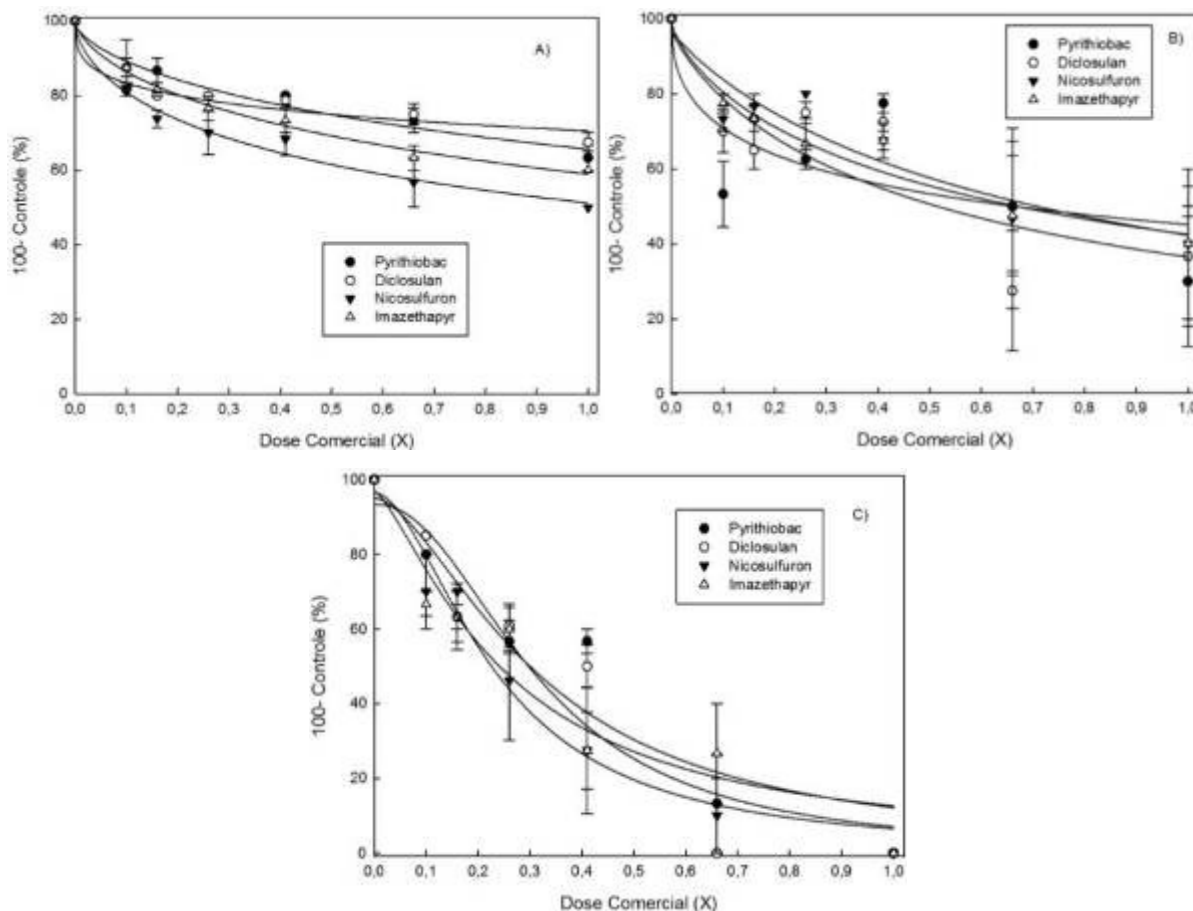


Figura 2.1 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Suscetível de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.2. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Os valores de  $C_{50}$  para o biótipo S (Tabela 2.2), aos 7 e 14 DAA foram variaram de 18 até doses maiores às máximas recomendadas (1x) e para o  $C_{80}$  todos os valores foram superiores as doses máximas recomendadas. Isto é explicado pela natureza sistêmica dos inibidores da ALS, que resulta em períodos de tempo maiores para levar à morte ou supressão do desenvolvimento das plantas, comparativamente aos herbicidas de contato. A morte das plantas pode demorar de 10 dias até dois meses, dependendo da velocidade de desenvolvimento das plantas (TREZZI; VIDAL, 2001). Aos 21 DAA, com a dose comercial se obteve o controle de 100% com todos os herbicidas testados. Neste período, os valores de  $C_{50}$  e  $C_{80}$  foram inferiores aos 7 e 14 DAA, variando o  $C_{50}$  de 10,5 (diclosulan) até 24 (imazethapyr), e o  $C_{80}$  variando de 20 (diclosulan) até 67 (imazethapyr).

Tabela 2.2 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Suscetível aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros <sup>1</sup>				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>		
7	Pyrithiobac	99	0,65	>42	0,98	>42	>42
	Diclosulan	100	0,32	>35	0,98	>35	>35
	Nicosulfuron	100	0,61	>60	0,99	>60	>60
	Imazethapyr	100	0,64	>100	0,99	>100	>100
14	Pyrithiobac	99	0,48	29,6	0,80	27,7	>42
	Diclosulan	97	0,85	19,3	0,87	18	>35
	Nicosulfuron	97	0,92	45,6	0,94	42,6	>60
	Imazethapyr	99	0,76	68,5	0,98	67	>100
21	Pyrithiobac	95	1,68	13,4	0,95	12,6	30
	Diclosulan	93	2,18	11,1	0,95	10,5	20
	Nicosulfuron	96	1,81	14,1	0,99	13,6	29
	Imazethapyr	97	1,38	25,3	0,96	24	67

<sup>1</sup> Equação logística de 3 parâmetros  $f = a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b)$ ; A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva. C<sub>50</sub>= Dose (g i.a. ha<sup>-1</sup>) que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose (g i.a. ha<sup>-1</sup>) necessária para gerar 80% de controle. \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\* Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para os biótipos R, o controle exercido pelos herbicidas testados na dose comercial (1x) foi pouco expressivo, chegando ao máximo de 45 % de controle (Figuras 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5).

Para o biótipo Medianeira, com a dose comercial (1x) os níveis de controle máximo aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 2.2 A, B e C) foram de 17, 40 e 40%, obtidos, respectivamente, com os herbicidas pyriithiobac, nicosulfuron e nicosulfuron. Com a maior dose testada (16,4x), os controles máximos obtidos aos 7, 14 e 21 DAA, foram 50% (imazethapyr), 70% (nicosulfuron) e 100% (nicosulfuron), respectivamente.

Os níveis de controle obtidos com a dose comercial (1x) foram muito baixos, indicativo da resistência deste biótipo a estes herbicidas. O controle de 100% só foi obtido com o nicosulfuron, com a dose 984 g i.a. ha<sup>-1</sup> (16,4x), aos 21 DAA. Os níveis mais elevados de controle foram obtidos com o nicosulfuron, seguido do imazethapyr, pyriithiobac e diclosulan.

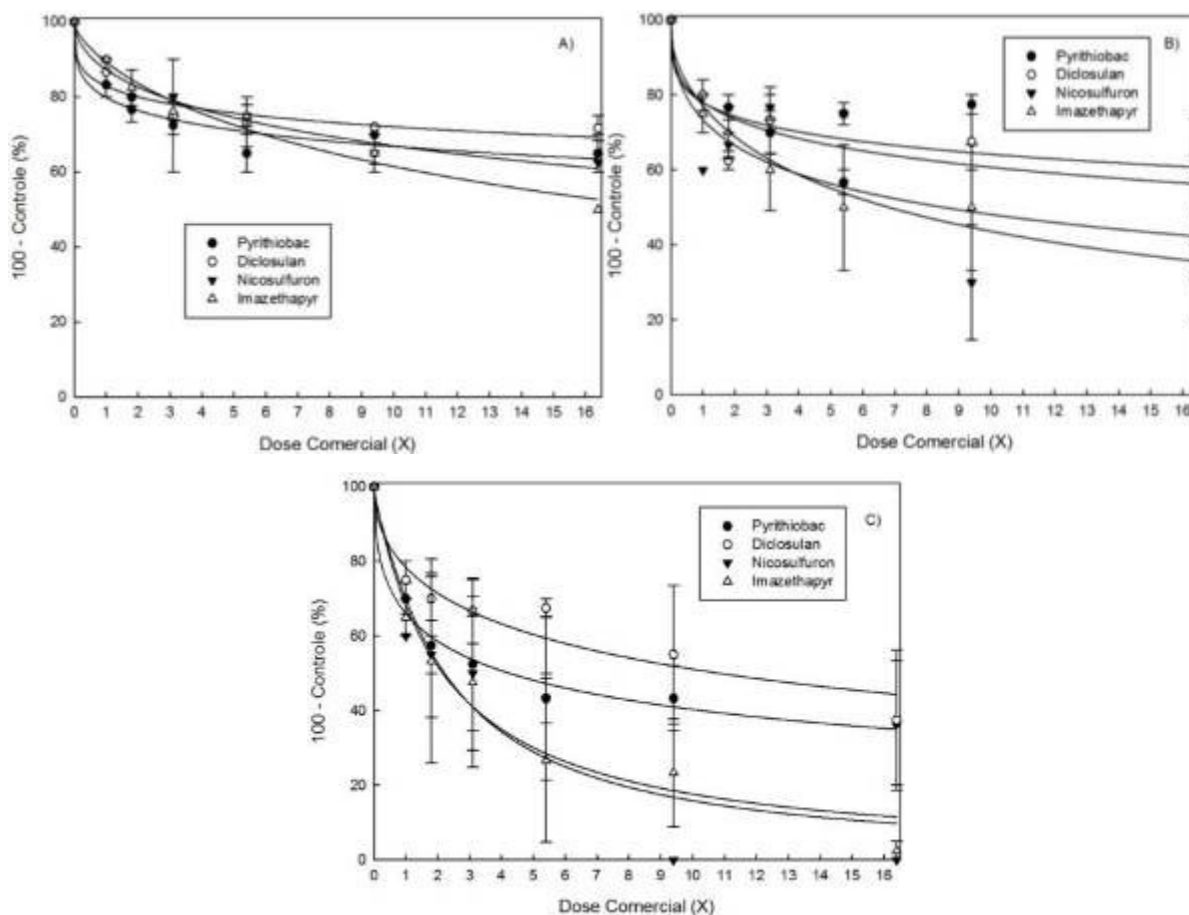


Figura 2.2 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Medianeira de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.3. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Os valores de  $C_{50}$  e  $C_{80}$  são descritos na Tabela 2.3. Para o biótipo Medianeira, aos 7 e 14 DAA os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  foram superiores aos obtidos aos 21 DAA, demonstrando tendência de diminuição dos valores de  $C_{50}$  com o decorrer do período de avaliação, como já observado no biótipo S. Isso é explicado pela evolução dos níveis de controle com o passar do tempo.

Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  aos 7 DAA foram superiores às doses máximas utilizadas (16,4x). Aos 14 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 414 (nicosulfuron) até acima da dose máxima utilizada (pyrithiobac e diclosulan). Os  $C_{80}$  neste período foram superiores as doses máximas utilizadas. Aos 21 DAA os menores valores de  $C_{50}$  e  $C_{80}$  obtidos foram de 133 e 467 g i.a. ha<sup>-1</sup>, ambos com a aplicação de nicosulfuron.

Para os três períodos de avaliação, o nicosulfuron foi o herbicida que apresentou os menores  $C_{50}$  e  $C_{80}$ , isto devido ao maior controle exercido. Já o imazethapyr, pyrithiobac e o diclosulan apresentaram os maiores  $C_{50}$  e  $C_{80}$ , devidos o menor controle obtido destes herbicidas neste biótipo.

O FR é a expressão do número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% da população R é superior à dose que controla 50% da população S (CHRISTOFFOLETI, 2002). Os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, apresentados pelo biótipo Medianeira foram 40 (pyrithiobac), 109 (pyrithiobac) e 36 (diclosulan), respectivamente (Tabela 2.3), enquanto que os menores FR's para os mesmos períodos foram 11(imazethapyr), 10 (nicosulfuron) e 9 (imazethapyr). Para  $FR < 10$ , o biótipo apresenta uma resistência moderada e  $FR > 10$  apresenta alto nível de resistência (TRANEL; WRIGHT, 2002).

Com os FR's e dados de controle observados, confirma-se a resistência do biótipo Medianeira aos herbicidas pyrithiobac, diclosulan, nicosulfuron e imazethapyr, assim confirmando a resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas.

Tabela 2.3 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Medianeira, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Pyrithiobac	100	0,29	>689	0,97	>689	>689	40
	Diclosulan	100	0,27	>574	0,97	>574	>574	21
	Nicosulfuron	100	0,52	>984	0,99	>984	>984	35
	Imazethapyr	99	0,73	>1640	0,99	>1640	>1640	11
14	Pyrithiobac	100	0,30	>689	0,87	>689	>689	109
	Diclosulan	99	0,37	>574	0,88	>574	>574	64
	Nicosulfuron	96	0,70	468	0,83	414	>984	10
	Imazethapyr	100	0,47	842	0,99	860	>1640	13
21	Pyrithiobac	100	0,46	177	0,99	179	>689	14
	Diclosulan	99	0,55	394	0,97	380	>574	36
	Nicosulfuron	97	1,13	141	0,94	133	467	10
	Imazethapyr	99	1,01	220	0,99	216	860	9

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Vilhena, o único não originário do Paraná, com a dose comercial (1x) os controles máximos aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 2.3 A, B e C) foram de 20% (nicosulfuron e imazethapyr), 25% (pyrithiobac) e 40% (nicosulfuron), respectivamente. Com a dose 16,4x, os controles máximos encontrados aos 7, 14 e 21 DAA, foram 40% (pyrithiobac e imazethapyr), 50% (pyrithiobac) e 100%

(nicosulfuron), respectivamente.

Com exceção do herbicida nicosulfuron, que resultou em 100% de controle do biótipo de Vilhena aos 21 DAA, as maiores doses (16,4 X) resultaram em níveis de controle inferiores a 50%. Esses níveis de controle podem ser considerados baixos, comparativamente ao biótipo S, em que foram atingidos níveis de controle de 100% para todos os herbicidas, aos 21 DAA na dose 1x (Figura 2.1 C).

Em ordem crescente de controle, os herbicidas seriam arranjados da seguinte forma para este biótipo: pyriithiobac < imazethapyr < diclosulan < nicosulfuron.

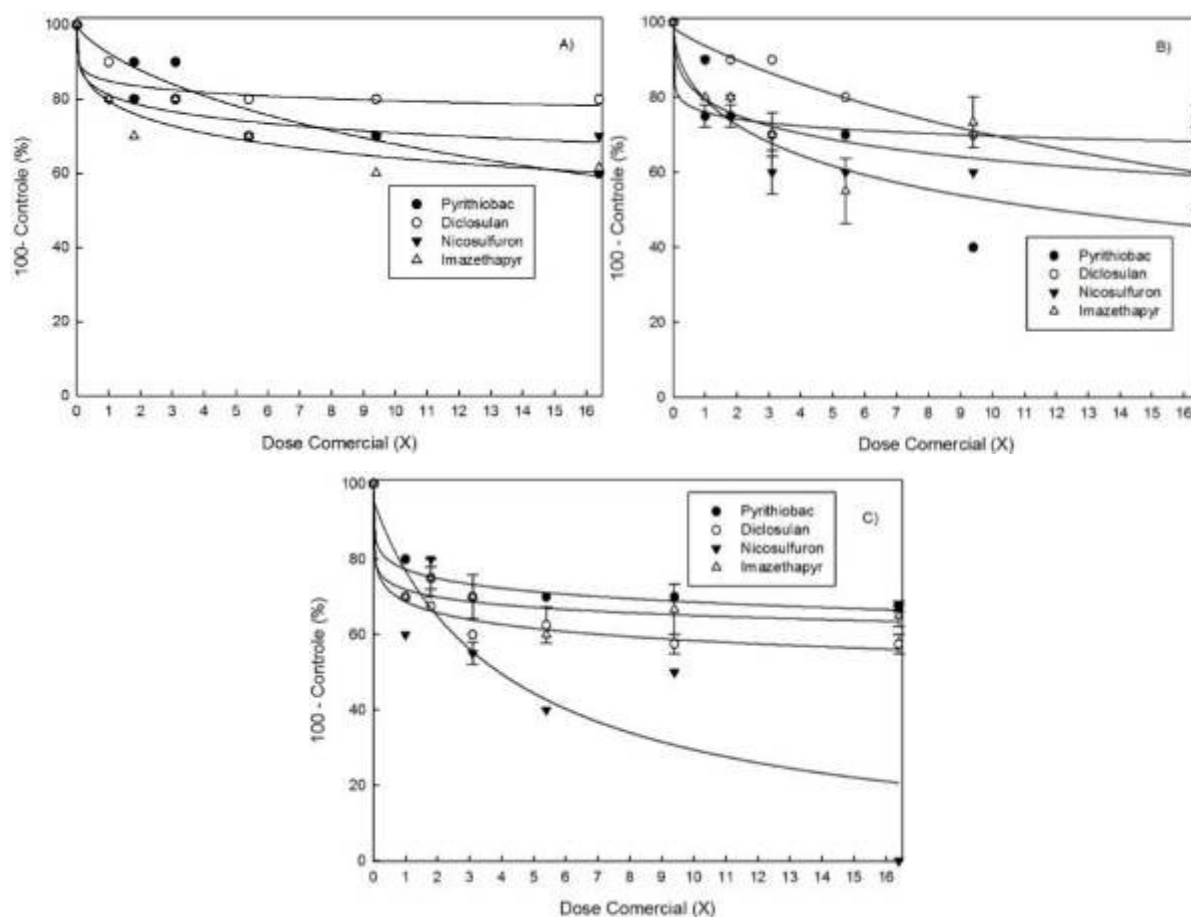


Figura 2.3 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Vilhena de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.4. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  para os três períodos de avaliação foram elevados (Tabela 2.4). Aos 7 DAA, o  $C_{50}$  foram superiores às doses máximas testadas. Aos 14 DAA os  $C_{50}$  variaram de 504 (pyriithiobac) até doses superiores à máxima (16,4x) e aos 21 DAA, variaram de 234 (nicosulfuron) até doses superiores à máxima (16,4x). Os  $C_{80}$ ,



aos 7, 14 e 21 DAA, foram superiores às doses máximas testadas. Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  chamam atenção pelos elevados valores, superiores aos determinados, no biótipo Medianeira (Tabela 2.3) e muito superiores aos encontrados com o biótipo S (Tabela 2.2).

Os maiores FR aos 7, 14 e 21 DAA, foram 3224 (diclosulan), 5724 (imazethapyr) e 3579 (imazethapyr), respectivamente (Tabela 2.4). Para todos os períodos o menor valor de FR foi de 10. Assim, confirma-se a resistência cruzada aos grupos químicos imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas para o biótipo Vilhena.

Tabela 2.4 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle ( $C_{50}$ ) e ( $C_{80}$ ) para o biótipo Vilhena, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				$C_{50}^{**}$	$C_{80}^{**}$	FR
		A	B	$C_{50}^*$	$R^2$			
7	Pyriithiobac	100	0,76	>689	0,96	>689	>689	10
	Diclosulan	100	0,16	>574	0,93	>574	>574	3224
	Nicosulfuron	100	0,25	>984	0,97	>984	>984	340
	Imazethapyr	100	0,34	>1640	0,95	>1640	>1640	32
14	Pyriithiobac	99	0,55	513	0,93	504	>689	18
	Diclosulan	98	0,91	>574	0,99	>574	>574	50
	Nicosulfuron	101	0,34	>984	0,84	>984	>984	68
	Imazethapyr	100	0,14	>1640	0,81	>1640	>1640	5724
21	Pyriithiobac	100	0,19	>689	0,99	>689	>689	1900
	Diclosulan	100	0,20	>574	0,99	>574	>574	187
	Nicosulfuron	96	0,97	259	0,89	234	>984	17
	Imazethapyr	100	0,14	>1640	0,96	>1640	>1640	3579

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva,  $C_{50}$ = Dose que proporciona controle de 50%.  $C_{80}$ = Dose necessária para gerar 80% de controle. FR =  $C_{50}$  resistente/  $C_{50}$  suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Bom Sucesso do Sul, na dose comercial (1x), os controles máximos aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 2.4 A, B e C) foram 17% (imazethapyr), 23% (imazethapyr) e 43% (imazethapyr), respectivamente. Com a maior dose (16,4x), os máximos controles encontrados aos 7, 14 e 21 DAA, foram 30% (nicosulfuron e imazethapyr), 50% (imazethapyr) e 53,3% (imazethapyr), respectivamente.

O biótipo Bom Sucesso do Sul apresentou níveis de controle muito inferiores aos determinados nos biótipos, Medianeira (Figura 2.2) e Vilhena (Figura

2.3). Enquanto o nível máximo de controle detectado em Bom Sucesso do Sul na dose 16,4x foi de 53%, nos biótipos Medianeira e Vilhena os controles máximos foram de 100%, ambos obtidos com o nicosulfuron. Isto demonstra o alto nível de resistência deste biótipo em comparação a Medianeira e Vilhena. Em ordem crescente de controle os herbicidas seriam arranjados da seguinte forma para este biótipo: diclosulan < pyriithiobac < nicosulfuron < imazethapyr.

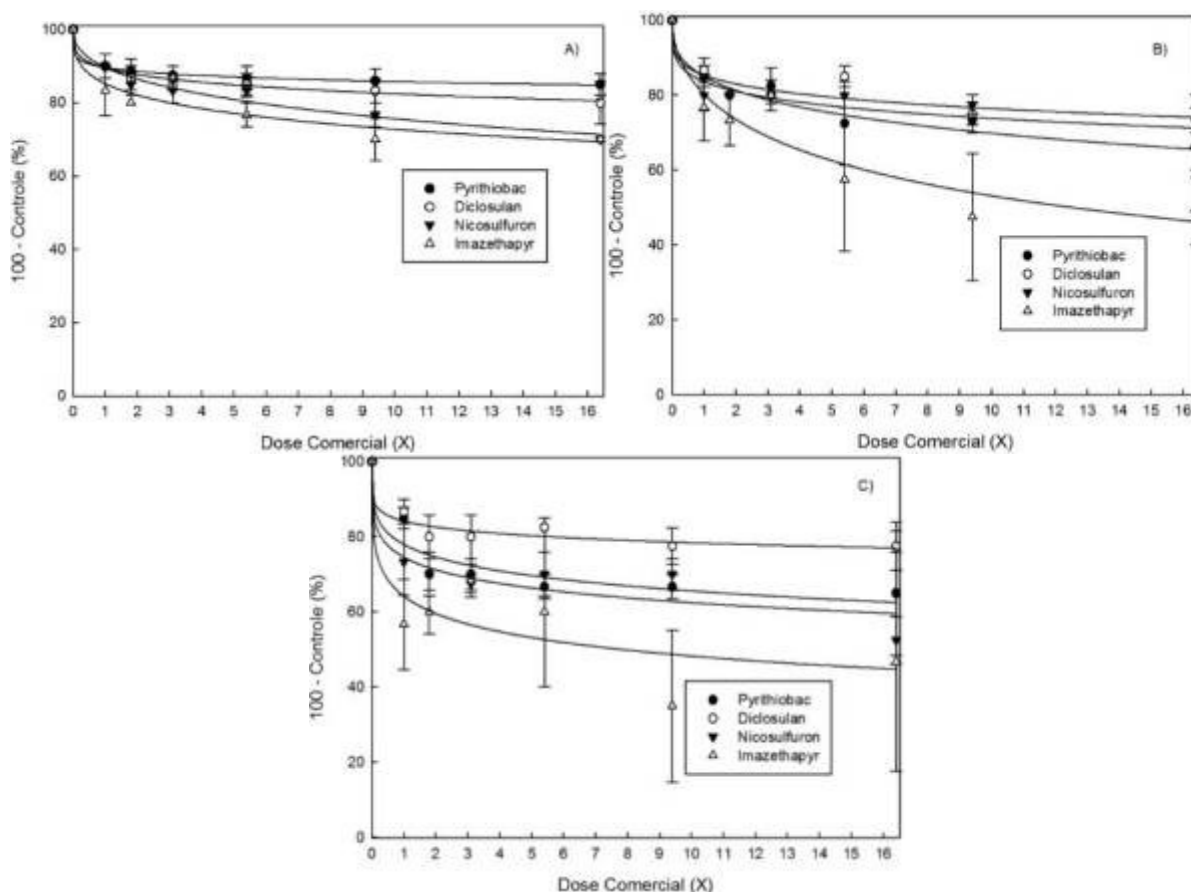


Figura 2.4 - Controle [100- Controle (%)] do biótipo Bom Sucesso do Sul de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21(C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.5. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  aos 7 DAA (Tabela 2.5) foram elevados, sendo em geral superiores às doses máximas empregadas (16,4x). Aos 14 e 21 DAA, os menores  $C_{50}$  encontrados foram 1255 e 780 (imazethapyr), respectivamente. O biótipo Bom Sucesso do Sul apresentou os níveis mais altos de resistência, comparativamente aos demais biótipos.

Os menores FR's verificados aos 7, 14 e 21 DAA foram de 107, 19 e 33, respectivamente, obtidos com o imazethapyr. Os herbicidas que apresentaram os maiores FR's nestes mesmos períodos foram o pyriithiobac e o diclosulan.

Os elevados níveis de resistência do Bom Sucesso do Sul comprovam existência de resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonilidas.

Tabela 2.5 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Bom Sucesso do Sul, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Pyriithiobac	100	0,16	>689	0,99	>689	>689	382982
	Diclosulan	100	0,26	>574	0,99	>574	>574	271
	Nicosulfuron	100	0,45	>984	0,99	>984	>984	115
	Imazethapyr	100	0,34	>1640	0,95	>1640	>1640	107
14	Pyriithiobac	100	0,26	>689	0,97	>689	>689	838
	Diclosulan	100	0,25	>574	0,94	>574	>574	2001
	Nicosulfuron	99	0,40	>984	0,90	>984	>984	117
	Imazethapyr	100	0,56	1269	0,95	1255	>1640	19
21	Pyriithiobac	100	0,27	>689	0,95	>689	>689	370
	Diclosulan	100	0,17	>574	0,97	>574	>574	80348
	Nicosulfuron	100	0,25	>984	0,95	>984	>984	350
	Imazethapyr	100	0,28	796	0,91	780	>1640	33

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

A aplicação da dose comercial dos inibidores da ALS (1x) no biótipo Vitorino resultou em níveis de controle máximo de 15% (nicosulfuron e imazethapyr), 27% (nicosulfuron) e 45% (diclosulan), respectivamente, aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 2.5 A, B e C). Com a maior dose (16,4x), os níveis máximos de controle aos 7, 14 e 21 DAA, foram 40% (imazethapyr), 55% (nicosulfuron) e 87% (nicosulfuron), respectivamente.

O biótipo Vitorino apresentou níveis de controle inferiores aos detectados nos biótipos Medianeira (Figura 2.2) e Vilhena (Figura 2.3), e controle superior ao Bom Sucesso do Sul (Figura 2.4). Para o Medianeira e Vilhena o controle máximo na dose 16,4x foi 100% (nicosulfuron) para ambos, enquanto no Bom Sucesso do Sul foi de 53,3% (imazethapyr) e em Vitorino foi de 87% (nicosulfuron).

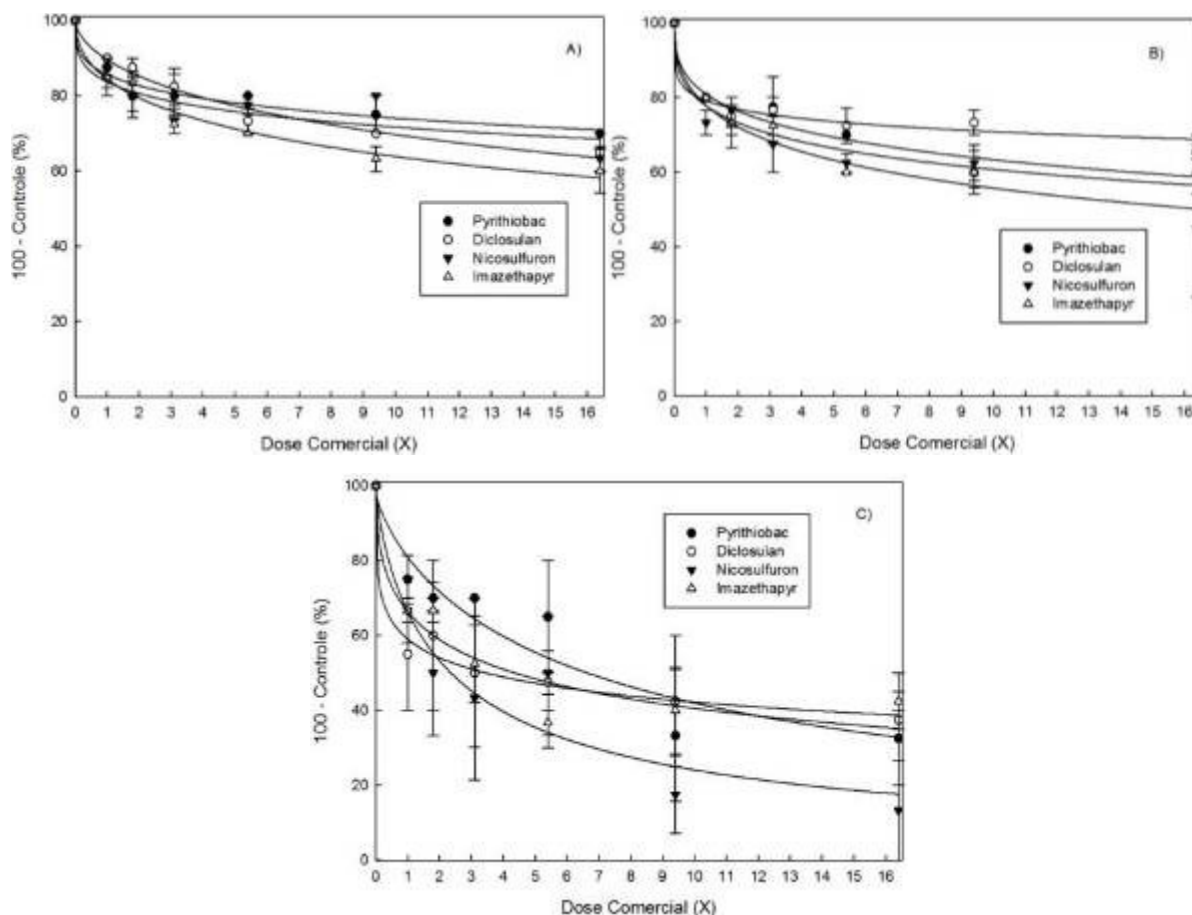


Figura 2.5 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Vitorino de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21(C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.6. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Houve tendência de diminuição dos  $C_{50}$  e  $C_{80}$  do biótipo Vitorino com o decorrer do período de avaliação, em função dos níveis de controle crescentes proporcionados pelos herbicidas. Aos 7 e 14 DAA, os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  foram superiores às doses máximas utilizadas. Aos 21 DAA, os  $C_{50}$  foram superiores a 121 (diclosulan) e os  $C_{80}$  superiores a 810 (nicosulfuron) (Tabela 2.6).

Os menores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, foram 3 (diclosulan), 24 (nicosulfuron) e 10 (nicosulfuron), respectivamente. Os níveis de resistência do Vitorino comprovam existência da resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas.

Tabela 2.6 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Vitorino, aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Pyriithiobac	100	0,32	>689	0,98	>689	>689	99
	Diclosulan	100	0,56	>574	0,99	>574	>574	3
	Nicosulfuron	100	0,31	>984	0,91	>984	>984	191
	Imazethapyr	100	0,48	>1640	0,99	>1640	>1640	19
14	Pyriithiobac	100	0,39	>689	0,98	>689	>689	62
	Diclosulan	100	0,19	>574	0,99	>574	>574	1875
	Nicosulfuron	99	0,45	>984	0,97	>984	>984	24
	Imazethapyr	100	0,35	>1640	0,98	>1640	>1640	51
21	Pyriithiobac	98	0,80	294	0,96	278	>689	22
	Diclosulan	100	0,30	121	0,99	121	>574	12
	Nicosulfuron	100	0,80	143	0,97	141	810	10
	Imazethapyr	100	0,46	428	0,96	435	>1640	18

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

#### 2.4.2 Massa da Parte Aérea Verde e Massa da Parte Aérea Seca

Todos os biótipos apresentaram reduções na massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS), com o aumento das doses dos herbicidas (Figuras 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 e 2.10).

O aumento das doses dos herbicidas resultaram em grandes reduções de MPAV e MPAS do biótipo S, em relação à testemunha (Figura 2.6 A e B). A maior dose (1x) provocou reduções em MPAV (Figura 2.6 A) entre 79% (pyriithiobac) e 85% (diclosulan), em relação à testemunha sem aplicação e reduções na MPAS (Figura 2.6 B) entre 85% (pyriithiobac) e 91% (imazethapyr), que estão de acordo com os elevados níveis de controle obtidos com estes herbicidas na avaliação aos 21 DAA (Figura 2.1 C).

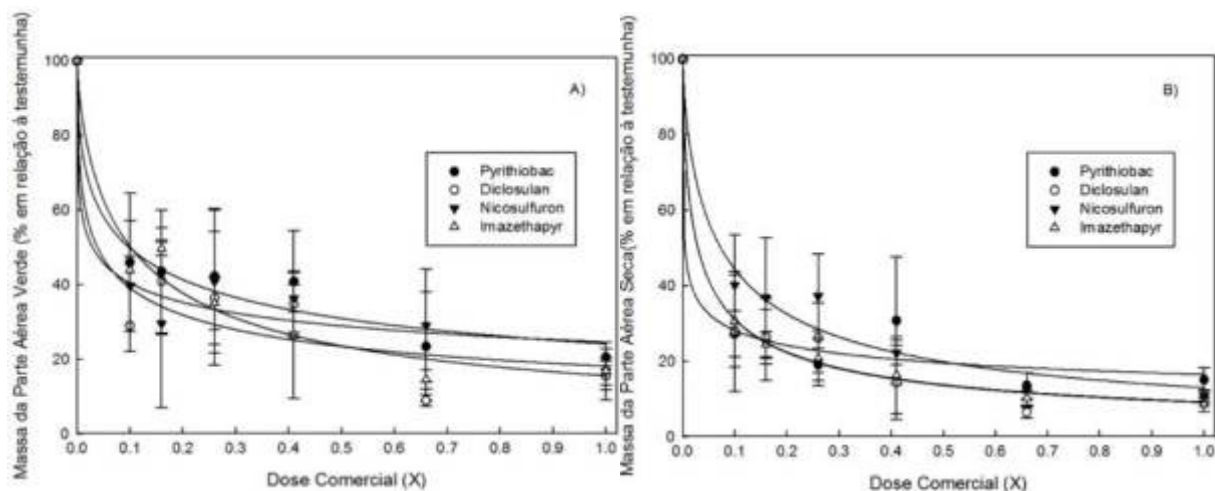


Figura 2.6 - Massa da parte aérea verde (MPAV) (A) e massa da parte aérea seca (MPAS) (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Suscetível, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.7. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  são descritos na Tabela 2.7. Estes valores são inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 2.2), isto explicado pelas reduções severa da MPAV e MPAS em relação à testemunha, já nas primeiras doses dos herbicidas.

Para a MPAV o maior  $GR_{50}$  foi 10,25 (imazethapyr), o maior  $GR_{80}$  foi 138 (nicosulfuron). Já para a MPAS o maior  $GR_{50}$  foi de 4,43 (nicosulfuron) e o maior  $GR_{80}$  foi de 67 (imazethapyr) (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) para o biótipo Suscetível. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>		
Massa da parte aérea verde – MPAV	Pyriithobac	100	0,49	4,18	0,98	4,16	69,3
	Diclosulan	100	0,46	1,37	0,96	1,37	27,3
	Nicosulfuron	100	0,32	1,78	0,98	1,78	138
	Imazethapyr	100	0,74	10,25	0,99	10,25	66
Massa da parte aérea seca – MPAS	Pyriithobac	100	0,30	0,18	0,99	0,18	19,3
	Diclosulan	100	0,65	1,03	0,99	1,03	8,8
	Nicosulfuron	100	0,73	4,43	0,99	4,43	29,4
	Imazethapyr	100	0,65	2,95	0,99	2,95	67

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Medianeira (Figura 2.7 A e B), foram constatadas reduções de MPAV elevadas, relativamente à testemunha, entre 74% (pyriithobac) e 91% (nicosulfuron) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 88% (diclosulan) e 97% (imazethapyr). As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 79% (pyriithobac) e 92% (imazethapyr). Na dose de 16,4x as reduções em relação à testemunha variaram entre 92% (diclosulan) e 96% (pyriithobac e imazethapyr).

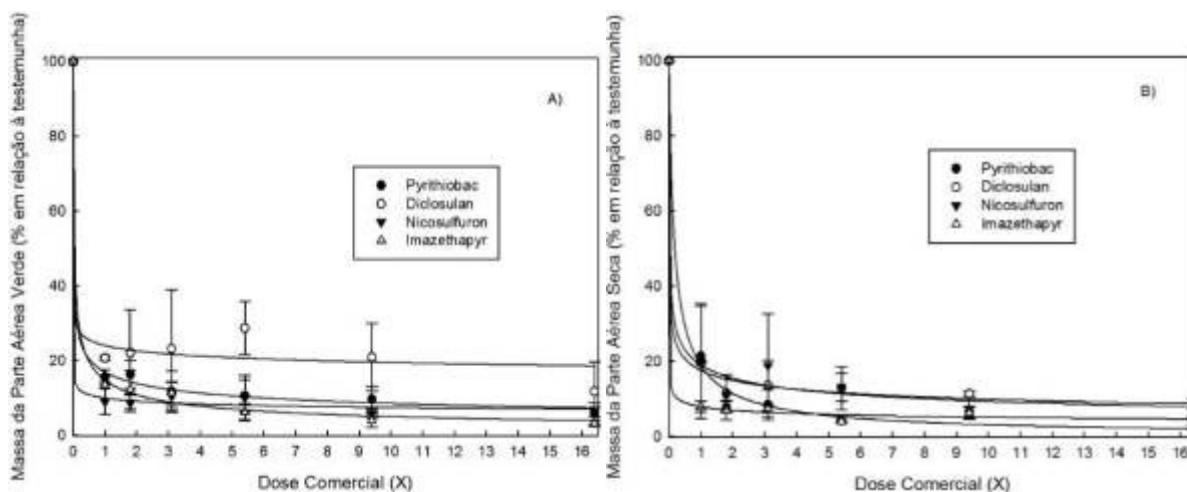


Figura 2.7 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Medianeira, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.8. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os GR<sub>50</sub>, GR<sub>80</sub> e FR da MPAV e MPAS são descritos na Tabela 2.8. Os valores são inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 2.3), devido à

alta redução de MPAV e MPAS em relação à testemunha, já nas primeiras doses utilizadas.

Para a MPAV o maior GR<sub>50</sub> foi 3,33 (imazethapyr) e o maior GR<sub>80</sub> foi de 263 (diclosulan). Na MPAS o maior GR<sub>50</sub> foi 7,6 (pyrithiobac) e o maior GR<sub>80</sub> foi 51 para o nicosulfuron (Tabela 2.8).

O maior FR para a MPAV foi 0,3 (imazethapyr), enquanto para a MPAS foi 41 (pyrithiobac). Observa-se que os FR's, com exceção do obtido com o pyrithiobac para a MPAS, em geral foram baixos, porém, verificando o comportamento das curvas de MPAV e MPAS, observa que a partir da dose 1x não há grandes reduções de MPAV e MPAS, com o aumento das doses.

Apesar disso, os FR's obtidos com a variável controle foram bastante elevados, sendo superiores a 9 (Tabela 2.3) e pode-se afirmar que existe a resistência cruzada do biótipo Medianeira aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas.

Tabela 2.8 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Medianeira. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Pyrithiobac	100	0,34	0,4	0,99	0,4	23	0,1
	Diclosulan	100	0,12	0,002	0,99	0,002	263	0,001
	Nicosulfuron	100	0,14	<0,001	0,99	<0,001	0,2	<0,001
	Imazethapyr	100	0,51	3,3	0,99	3,3	49	0,3
Massa da parte aérea seca – MPAS	Pyrithiobac	100	0,85	7,6	0,99	7,6	39	41
	Diclosulan	100	0,29	0,2	0,99	0,2	21	0,2
	Nicosulfuron	100	0,36	1	0,99	1	51	0,2
	Imazethapyr	100	0,20	0,001	0,99	0,001	1	<0,001

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Vilhena (Figura 2.8 A e B), foram constatadas reduções de MPAV elevadas, relativamente à testemunha, entre 45% (diclosulan) e 65% (imazethapyr) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 69% (diclosulan) e 90% (pyrithiobac). As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 56% (nicosulfuron) e 88% (pyrithiobac). Na dose de 16,4x as



reduções em relação à testemunha variaram entre 85% (nicosulfuron) e 92% (imazethapyr).

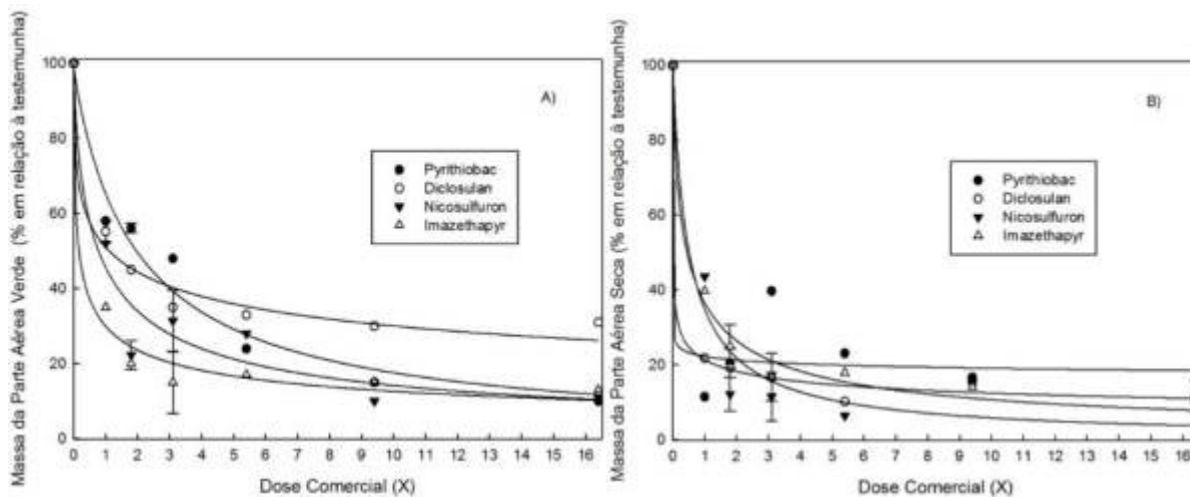


Figura 2.8 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vilhena, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.9. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  do biótipo Vilhena (Tabela 2.9) foram inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 2.4).

Para a MPAV o maior  $GR_{50}$  foi de 82 (pyriithobac) e o maior  $GR_{80}$  foi obtido com o diclosulan, com dose acima da máxima utilizada ( $>574$ ). Na MPAS o maior  $GR_{50}$  foi 45 (imazethapyr) e o maior  $GR_{80}$  foi 341 (imazethapyr) (Tabela 2.9).

Os FR's para a MPAV variaram entre 2 (imazethapyr) e 28 (diclosulan), enquanto para a MPAS variaram entre  $<0,01$  (pyriithobac) e 15 (imazethapyr). O valor de FR abaixo de zero para o herbicida pyriithobac pode ser explicado pelos baixos níveis de controle do biótipo S obtidos com este herbicida. Os FR da MPAV e MPAS foram mais baixos que os observados nas avaliações de controle (Tabela 2.4), no entanto os resultados de MPAV e a MPAS complementam a confirmação de que o biótipo Vilhena apresenta resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas e indicam níveis de resistência superiores aos constatados no biótipo Medianeira.

Tabela 2.9 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas(g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vilhena. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Pyriithiobac	99	0,95	84	0,99	82	355	20
	Diclosulan	100	0,38	39	0,99	39	>574	28
	Nicosulfuron	100	0,71	47	0,97	47	330	26
	Imazethapyr	100	0,47	17	0,99	17	310	2
Massa da parte aérea seca – MPAS	Pyriithiobac	100	0,08	<0,01	0,95	0,0	210	<0, 01
	Diclosulan	100	0,28	0,3	0,99	0,3	47	0,3
	Nicosulfuron	100	0,93	31	0,97	31	135	7
	Imazethapyr	100	0,68	45	0,99	45	341	15

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Bom Sucesso do Sul (Figura 2.9 A e B), foram constatadas reduções de MPAV relativamente à testemunha, entre 24% (diclosulan) e 43% (imazethapyr) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 43% (nicosulfuron) e 78% (diclosulan). As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 45% (pyriithiobac) e 87% (imazethapyr). Na dose de 16,4x as reduções em relação à testemunha variaram entre 89% (pyriithiobac, diclosulan e nicosulfuron) e 93% (imazethapyr).

Com a dose 1x, o biótipo S, obteve em relação à testemunha, reduções de MPAV e MPAS superiores a 79% e 85%, respectivamente, demonstrando a grande diferença deste para com o biótipo S. Comparativamente aos biótipos Medianeira e Vilhena, a aplicação da dose comercial dos herbicidas (1x) nas plantas do biótipo Bom Sucesso do Sul provocou menores reduções da MPAV e MPAS em relação à testemunha.

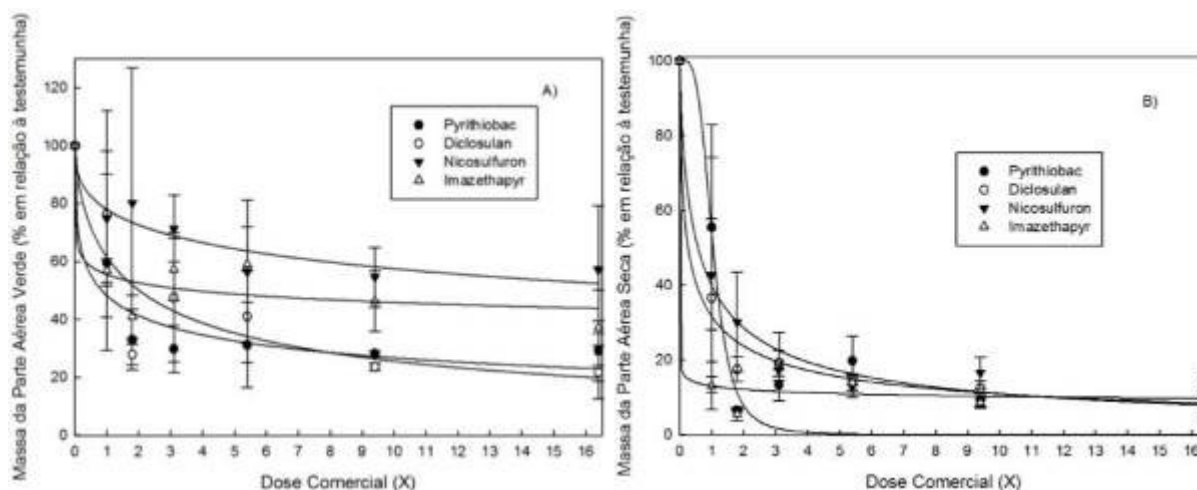


Figura 2.9 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Bom Sucesso do Sul, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.10. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  do biótipo Bom Sucesso do Sul (Tabela 2.10) são inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 2.5). Para a MPAV, o maior  $GR_{50}$  foi  $>984$  (nicosulfuron) e todos os  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas. Para a variável MPAS, o maior  $GR_{50}$  foi de 44 (pyriithiobac) e o maior  $GR_{80}$  foi de 228 (nicosulfuron) (Tabela 2.10).

Os  $FR$ 's para a MPAV variaram entre 9 (pyriithiobac) e 691 (nicosulfuron), enquanto para a MPAS variaram entre  $<0,01$  (imazethapyr) e 238 (pyriithiobac). Os  $FR$ 's da MPAV e MPAS foram inferiores aos observados no controle (Tabela 2.5).

Os  $FR$ 's da MPAV e a MPAS completam a confirmação que este biótipo apresenta resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas. Apresentando nível de resistência superior aos biótipos Medianeira e Vilhena.

Tabela 2.10 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Bom Sucesso do Sul. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> *	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>	*		
Massa da parte aérea verde – MPAV	Pyriithiobac	100	0,41	35	0,96	35	>689	9
	Diclosulan	100	0,66	69	0,91	70	>574	51
	Nicosulfuron	100	0,42	>984	0,95	>984	>984	691
	Imazethapyr	100	0,17	375	0,93	375	>1640	37
Massa da parte aérea seca – MPAS	Pyriithiobac	100	3,82	44	0,95	44	63,4	238
	Diclosulan	100	0,58	9	0,99	9	101,5	9
	Nicosulfuron	100	0,73	34	0,99	34	228	8
	Imazethapyr	100	0,12	<0,01	0,99	<0,01	1,5	<0,01

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Vitorino (Figura 2.10 A e B), foram constatadas reduções de MPAV relativamente à testemunha, entre 3,6% (pyriithiobac) e 64% (imazethapyr) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 60% (pyriithiobac) e 84% (nicosulfuron). As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 29% (imazethapyr) e 61% (pyriithiobac e diclosulan). Na dose de 16,4x as reduções em relação à testemunha variaram entre 70% (pyriithiobac) e 80% (nicosulfuron).

Na dose 1x, o biótipo S, obteve em relação à testemunha, reduções de MPAV e MPAS superiores a 79% e 85%, respectivamente, demonstrando a grande diferença deste para com o biótipo S. O biótipo Vitorino, comparativamente aos biótipos Medianeira, Vilhena e Bom Sucesso do Sul, apresentou menores reduções em relação à testemunha, da MPAV e MPAS na dose 1x.

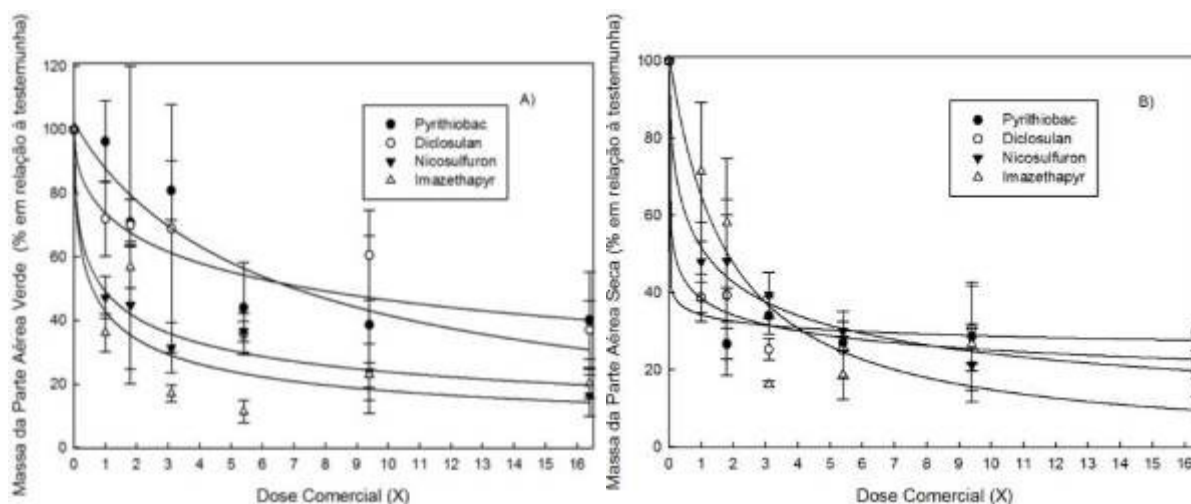


Figura 2.10 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vitorino, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 2.11. UTFPR, Pato Branco- PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  do biótipo Vitorino (Tabela 2.11), também foram inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 2.6). Para a MPAV o maior  $GR_{50}$  foi 298 (pyriithiobac) e os  $GR_{80}$  para o pyriithiobac e diclosulan foram superiores as doses máximas utilizadas. Na MPAS o maior  $GR_{50}$  foi 182 (imazethapyr) e os  $GR_{80}$  para o pyriithiobac e diclosulan foram superiores as doses máximas utilizadas (Tabela 2.11).

Os  $FR$ 's para a MPAV variaram entre 6 (imazethapyr) e 194 (diclosulan), enquanto para a MPAS variando entre 1 (pyriithiobac) e 61 (imazethapyr). Os  $FR$ 's da MPAV e MPAS foram inferiores aos observados no controle (Tabela 2.6).

Os  $FR$ 's da MPAV e a MPAS complementam a confirmação que o biótipo Vitorino biótipo resistência cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonilidas.

A correlação dos valores estimados de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  dos cinco biótipos testados através dos softwares SigmaPlot 10.0 e Excel foram significativas, variando entre 0,99 e 1 ( $p < 0,05$ ), o que demonstra a equivalência dos métodos de cálculo adotados.

Tabela 2.11 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vitorino. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Pyrithiobac	103	0,94	280	0,93	298	>689	72
	Diclosulan	100	0,51	265	0,89	265	>574	194
	Nicosulfuron	100	0,49	57	0,99	57	960	32
	Imazethapyr	100	0,54	59	0,93	59	770	6
Massa da parte aérea seca – MPAS	Pyrithiobac	100	0,11	0,1	0,99	0,1	>689	1
	Diclosulan	100	0,27	6	0,99	6	>574	6
	Nicosulfuron	100	0,53	69	0,99	69	954	16
	Imazethapyr	102	1,02	176	0,93	182	700	62

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa Sigmaplot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Segundo os critérios oficiais para a confirmação de resistência no Brasil (GAZZIERO et al., 2008), experimentos em ambiente controlado e em campo devem ser realizados para efetivamente conferir se uma população suspeita é R ou S. Sendo assim, experimentos a campo deveriam ser executados para confirmar a resistência constatada ao nível de casa de vegetação.

Alguns herbicidas apresentam níveis de resistência maiores e outros, níveis de resistência menores. Cabe ressaltar que a resistência é influenciada por fatores relacionados a características das plantas daninhas, dos herbicidas e das práticas culturais (WINKLER et al., 2002). Os valores de FR são variáveis, de acordo com o herbicida utilizado, biótipo, condições de ambiente e variável mensurada, o que leva a encontrar na literatura valores distinto de FR em ensaios com EPHHL, para distintos inibidores da ALS, como observados no presente trabalho.

Testando o efeito dos herbicidas chlorimuron-ethyl e imazethapyr, sobre EPHHL, Gelmini et al., (2001) encontraram FR 's para a variável controle de 19 e 26, e para a fitomassa de 22 e 23, respectivamente para chlorimuron-ethyl e imazethapyr. Já Gelmini et al., (2005) obtiveram FR's para a variável controle superiores a 17 e 25, e para o peso fresco, superiores a 17 e 24, respectivamente para o chlorimuron-ethyl e o imazethapyr. Trezzi et al., (2005) encontraram valores de FR a imazethapyr para biótipos de EPHHL superiores a 15.

Para outras espécies daninhas na literatura também se verifica a existência de distintos FR's entre herbicidas inibidores da ALS. Os FR's do biótipo R

de *B. pilosa* foram de 40,92, 173,84, 57,47 e 57,16 para os herbicidas inibidores da ALS, chlorimuron-ethyl, nicosulfuron, metsulfuron-methyl, e imazethapyr, respectivamente (CHRISTOFFOLETI, 2002). Christoffoleti et al. (1996) determinaram em *B. pilosa* para a variável fitomassa, FR's de 370, 39, 26 e 12 para o biótipo R, respectivamente para os herbicidas imazethapyr, nicosulfuron, metsulfuron-methyl e chlorimuron-ethyl. Monquero et al., (2000) obtiveram FR's para picão-preto de 9,9 para chlorimuron-ethyl, 9,07 para nicosulfuron e 27,03 para imazethapyr, e para *Amaranthus quitensis* (caruru) os FR's foram de 45,03 para o chlorimuron-ethyl, 181 para o nicosulfuron e 24,55 para o imazethapyr.

Neste trabalho é importante destacar que, todos os biótipos R eram provenientes de áreas de lavoura com uso intensivo de inibidores da ALS e, portanto, foram selecionados pela aplicação de herbicidas desse mecanismo de ação. Em todos os casos nas propriedades agrícolas de origem, o imazethapyr foi o principal agente selecionador da resistência, pelo seu uso muito frequente nestas propriedades. O nicosulfuron foi pouco utilizado em algumas propriedades para a cultura do milho. E não se tem relatos de aplicação de diclosulan, nestas áreas e o pyriithiobac nunca foi aplicado nestas propriedades, visto que é recomendado para a cultura do algodão, e não está registrado nos estados do Paraná e Rondônia (IHARA, 2013). No entanto esses biótipos apresentaram resistência cruzada aos quatro grupos químicos testados, das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidilbenzoatos e sulfonanilidas, mesmo considerando que alguns destes herbicidas nunca foram aplicados nestas áreas.

Portanto os resultados obtidos estão de acordo com a afirmação de Rizzardi et al., (2002) segundo os quais os biótipos R aos inibidores da ALS frequentemente apresentam resistência cruzada aos herbicidas pertencentes ao mesmo grupo químico com o qual o biótipo foi selecionado e, também, possuem resistência cruzada a outros grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS.

A resistência cruzada para herbicidas inibidores da ALS pertencentes aos diferentes grupos químicos é resultado de uma única mutação ou combinação de duas mutações separadas no gene que codifica a ALS, em que cada mutação resulta na resistência a um grupo de herbicidas inibidores da enzima (POWLES; PRESTON, 1995; WRIGHT et al., 1998; TRANEL et al., 2013).

Geralmente, os casos de biótipos R aos inibidores da ALS apresentam, como mecanismo de resistência, a enzima ALS cujo sítio de ação foi alterado e,

assim, torna-se insensível aos herbicidas (CHRISTOFFOLETI, 2001; OSUNA; PRADO, 2003; LAMEGO, 2008; CRUZ-HIPOLITO et al., 2013). No entanto, pode haver resistência aos inibidores da ALS baseada em mecanismos de resistência fora do local de ação, que pode conferir resistência cruzada aos herbicidas (D'ELYE, 2013), dentre estes a redução na absorção (PLAZA et al., 2006), translocação reduzida (RIAR et al., 2013) e metabolização do herbicida (NEIGHBORS; PRIVALLE, 1990; COTTERMAN; SAARI, 1992; PARK et al., 2004; YU et al., 2009).

A variação considerável do nível de resistência entre e dentro de vários grupos químicos de herbicidas inibidores da ALS se deve provavelmente à ligação sutilmente diferente por determinados herbicidas sobre a enzima ALS e mutações diferentes da ALS (POWLES; PRESTON 1995). Estudos de ligação competitiva indicam que os herbicidas inibidores da ALS se ligam ao mesmo, ou próximo do sítio ativo da ALS (DURNER et al., 1991; LANDSTEIN et al., 1993).

Diferenças nos níveis de resistência aos herbicidas podem ter ocorrido devido a diferenças na afinidade do herbicida com a enzima ALS, em função de diferentes ligações que ocorrem entre os resíduos de aminoácidos da enzima e radicais presentes nos herbicidas, que determinam níveis de atividade enzimática diferenciadas conforme o herbicida utilizado. A resistência decorrente de insensibilidade da enzima ao herbicida geralmente resulta em elevados valores de FR, pela alteração na composição da enzima ALS, resultante da(s) mutação(ões) ocorrida(s) na enzima (DEVINE; SHUKLA, 2000).

## 2.5 CONCLUSÕES

Todos os quatro biótipos de *Euphorbia heterophylla* com suspeita de resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX apresentam a resistência aos herbicidas inibidores da ALS. Segundo o nível decrescente de resistência, a seguinte ordem crescente pode ser estabelecida: Bom Sucesso do Sul > Vilhena > Vitorino > Medianeira.

A resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas foi confirmada para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira. Estes apresentaram resistência a herbicidas que nunca foram aplicados anteriormente nestes biótipos.



Os métodos de cálculo do  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  através dos softwares SigmaPlot 10.0 e Excel apresentaram elevadas correlações positivas e significativas, indicando que ambos os métodos podem ser empregados para o cálculo desses parâmetros.

### 3. CAPÍTULO II - RESPOSTA DE BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L. A DOSES DE HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX

#### 3.1 RESUMO

A aplicação repetida de herbicidas favorece o surgimento de espécies daninhas resistentes (R) aos mesmos. Atualmente, é um problema na agricultura mundial, com o crescente aparecimento de novos casos. Biótipos de leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) (EPHHL) com suspeita de resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX foram detectadas no estado do Paraná e Rondônia. Assim, objetivou-se com este trabalho: (1) confirmar a existência de novos biótipos de EPHHL com resistência a PROTOX nos estados do Paraná e Rondônia; (2) determinar se existe resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione (inibidores da PROTOX) nestes biótipos; (3) determinar os níveis de resistência nos biótipos suspeitos, por meio do cálculo dos fatores de resistência; (4) determinar se a análise de imagens através de software específico apresenta boa correlação com técnicas convencionais de avaliação da resposta de herbicidas para a espécie EPHHL. Foram realizados dois experimentos, simultaneamente, em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo o primeiro de resposta à dose em biótipo suscetível (S), em esquema fatorial 5x7, sendo cinco herbicidas inibidores da PROTOX fomesafen (difeniléteres), flumiclorac (ftalamidas), carfentrazone (triazolinonas), oxadiazon (oxadiazol) e saflufenacil (pirimidinedione) e sete proporções da dose comercial (x): 0x, 0,1x, 0,16x, 0,26x, 0,41x, 0,66x e 1x. O segundo experimento foi de resposta à dose em biótipos suspeitos de resistência, arranjado em fatorial 4 x 5 x 7, sendo o fator biótipos (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena), o fator herbicidas inibidores da PROTOX (os mesmos utilizados para o biótipo S) e sete proporções da dose comercial: 0x, 1x, 1,8x, 3,1x, 5,4x, 9,4x e 16,4x. Foram realizadas avaliações de controle visual e avaliações controle por imagens digitais aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA). Aos 21 DAA, determinou-se massa da parte aérea verde (MPAV) e, posteriormente, massa da parte aérea seca (MPAS). Foram calculadas as doses de herbicidas para proporcionar 50% ( $C_{50}$ ) e 80% ( $C_{80}$ ) de controle e para reduzir 50% ( $GR_{50}$ ) e 80% ( $GR_{80}$ ) da matéria verde e seca, e os fatores de resistência (FR). Os  $C_{50}$ ,  $C_{80}$ ,  $GR_{50}$ ,

GR<sub>80</sub> e FR's foram distintos, variando de acordo com biótipo, herbicida e variável mensurada. Houve elevada correlação entre as estimativas de C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub> obtidas através softwares SigmaPlot 10.0 e Excel, podendo ambos ser empregados. Os quatro biótipos com suspeita de resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX apresentaram a resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX. Em ordem decrescente dos níveis de resistência, os biótipos podem ser classificados como: Bom Sucesso do Sul > Vitorino > Medianeira > Vilhena. Além disso, confirmou-se os quatro biótipos apresentavam resistência cruzada a PROTOX inibidores de todos os grupos químicos testados. O método de avaliação através de imagens digitais pode ser um método adotado para avaliação de controle dos inibidores da PROTOX, pois apresenta correlação negativa significativa com a avaliação de controle visual.

### 3.2 ABSTRACT

The development of herbicide weed resistance is a serious problem in world agriculture. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) (EPHHL) biotypes suspected of multiple resistance to ALS and PROTOX inhibitors were detected in the state of Paraná and Rondônia. This study aimed: (1) to confirm the existence of new EPHHL biotypes with resistance to PROTOX inhibitors in the states of Paraná and Rondônia; (2) to determine whether there is cross-resistance to PROTOX inhibitors from other chemical groups, such as diphenyl ethers, N-phenyl-phthalimides, triazolinone, oxadiazole and pyrimidinedione in these biotypes; (3) to determine the levels of resistance on these biotypes; (4) to determine whether the image analysis through specific software are correlated with conventional herbicide effect assessment techniques on EPHHL. Two experiments were carried out simultaneously, at the greenhouse, in a completely randomized design, with four repetitions. On the first experiment, it was evaluated the herbicide dose response on susceptible (S) biotype, using a 5x7 factorial. The factor A consisted of five PROTOX-inhibiting herbicides fomesafen (diphenyl ether), flumiclorac (N-phenyl-phthalimides), carfentrazone (triazolinone), oxadiazon (oxadiazol) and saflufenacil (pyrimidinedione). The factor B consisted of seven proportions of commercial dose (x): 0x, 0,1x, 0,16x, 0,26x 0,41x, 0,66x e 1x. On the second experiment, it was evaluated the dose response on biotypes with suspected resistance (R), arranged in factorial 4 x 5 x 7. The factor A consisted of the biotypes (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira and Vilhena). The

factor B included the same PROTOX inhibitors as on the first experiment). The factor C were seven proportions of commercial dose: 0x, 1x, 1,8x, 3,1x, 5,4x, 9,4x e 16,4x. The assessments were the same described on the previous chapter. There was a high correlation between the estimates of C50 and GR50 obtained through software SigmaPlot 10.0 and Excel. On the four biotypes tested, it was confirmed the hypothesis of multiple herbicide resistance to ALS and PROTOX inhibitors. The level of resistance (in decreasing order) was: Bom Sucesso do Sul > Vitorino > Medianeira > Vilhena. Also, it was confirmed the four biotypes were cross-resistant to PROTOX-inhibitors from all chemical groups tested. The analysis of digital images can be an assessment method appropriate to evaluate the effect of PROTOX inhibitors and it correlates with the visual method.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A resistência de espécies daninhas aos herbicidas é uma resposta evolutiva às práticas agrícolas empregadas, influenciada por fatores ligados ao produto químico ou à biologia da planta, que também pode afetar a taxa na qual a resistência se desenvolve (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2001). A aplicação de herbicidas recorrente, de mesmo mecanismo de ação e espécies de plantas daninhas anuais que ocorrem em altas densidades populacionais são fatores de risco para a evolução da resistência aos herbicidas em plantas daninhas (FRISVOLD et al., 2009).

Para o controle adequado de populações de plantas daninhas resistentes (R) é necessária a utilização de herbicidas de mecanismos de ação diferentes dos geradores da resistência. Os herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) são usados como mecanismo alternativo para o controle de populações R (VIDAL; MEROTTO JR., 1999; RIZZARDI et al., 2004b), principalmente aos inibidores de ALS. Entretanto, o uso inadequado de herbicidas inibidores da PROTOX está levando ao surgimento de espécies com resistência aos mesmos.

A seleção de biótipos de plantas daninhas R aos herbicidas inibidores da PROTOX é registrada em lavouras de milho e soja, devido ao uso repetitivo destes, nestas áreas (HEAP, 2014). No mundo, são relatados atualmente casos de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX em *Acalypha australis*, *Amaranthus quitensis*, *A. Tuberculatus* (syn. *rudis*), *Ambrosia artemisiifolia*,

*Descurainia sophia* e *Euphorbia heterophylla* (EPHHL). Em 60% dos casos de resistência aos inibidores da PROTOX relatados no mundo ocorre resistência múltipla, sendo o segundo mecanismo envolvido na resistência constituído por inibidores da ALS, FSII e EPSPS. No Brasil, foi relatada a existência de dois biótipos de EPHHL com resistência múltipla aos inibidores da ALS/ PROTOX, nos municípios de Pato Branco e Vitorino, na região Sudoeste do Paraná (TREZZI et al., 2005; HEAP, 2014). Nos últimos anos, novos casos suspeitos de resistência de EPHHL a esses mecanismos foram relatados por agricultores deste estado e também no município de Vilhena (RO). Isto é preocupante porque os herbicidas com esses dois mecanismos de ação têm sido fundamentais para o controle de espécies daninhas em várias culturas agrícolas, anuais e perenes. Além disso, chama atenção o fato de que áreas de lavoura do estado de Rondônia, em que o histórico de cultivos é mais recente, apresentem casos suspeitos de resistência aos inibidores da ALS e da PROTOX.

A EPHHL é uma planta daninha de grande importância na agricultura mundial, por apresentar densidades populacionais elevadas e forte impacto econômico negativo (VIDAL; WINKLER, 2004). O seu controle seletivo é realizado, principalmente, com inibidores da ALS e da PROTOX (VIDAL; MEROTTO Jr, 2001).

A enzima PROTOX é importante na biossíntese das clorofilas e citocromos (FERREIRA, 2007). Em geral, os herbicidas inibidores da PROTOX possuem ação de contato, e após a absorção e pequena translocação até o local de ação, a luz é necessária para a ação desses herbicidas (MEROTTO JR.; VIDAL, 2001; FERREIRA et al. 2005).

Recentemente, foi registrado no Brasil o herbicida saflufenacil, inibidor da PROTOX desenvolvido para aplicação em pré-emergência, pré-plantio incorporado ou pós-emergência em inúmeras culturas, para controle de dicotiledôneas (BASF, 2008). A característica que o diferencia dos demais inibidores da PROTOX, é sua mobilidade no floema, que pode ser muito valiosa (ASHIGH; HALL, 2010). Isso faz com que este herbicida seja uma possível alternativa para utilização em espécies de difícil controle, como a EPHHL (MONQUERO et al., 2011).

Curvas dose resposta são utilizadas para determinar a resistência ou suscetibilidade de plantas daninhas aos herbicidas (LACERDA; VICTORIA FILHO, 2004). Na literatura especializada, encontram-se dados de resposta aos inibidores da PROTOX que demonstram a existência de biótipos de EPHHL R a esse

mecanismo (TREZZI et al., 2005; TREZZI et al., 2006, TREZZI et al., 2011a; TREZZI et al., 2011b).

Em experimentos de resposta de plantas daninhas aos herbicidas pode-se adotar diversas metodologias para avaliar alterações nas plantas, como controle visual, contagem de estande, mortalidade de plantas e determinação de biomassa. A adoção de novas metodologias para avaliar o efeito herbicida é interessante, visto que algumas técnicas são destrutivas, imprecisas e contêm níveis de subjetividade variáveis (WHALLEYA; SHANMUGANATHAN, 2013). Neste contexto foi desenvolvido a análise de imagens digitais para quantificar as alterações na cor das folhas causadas por ação de herbicidas, que se constitui alternativa útil e precisa para avaliação visual e de bioensaios de planta inteira (ALI et al., 2013). Esta avaliação consiste no processamento de imagens digitais, pela transformação dos valores de pixels para obter informações úteis de interesse (BROX, 2005).

Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram: confirmar a existência de novos biótipos de EPHHL com resistência a PROTOX nos estados do Paraná e Rondônia; determinar se existe resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione (inibidores da PROTOX) nestes biótipos; determinar os níveis de resistência nos biótipos suspeitos, por meio do cálculo dos fatores de resistência; determinar se a análise de imagens através de software específico apresenta boa correlação com técnicas convencionais de avaliação da resposta de herbicidas para a espécie EPHHL.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos de resposta a dose foram conduzidos em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Câmpus Pato Branco, localizado a latitude 26°07'S e longitude 52°41'W. O clima é classificado como subtropical úmido (Cfa), e altitude média de 760 m.

Para este trabalho utilizaram-se biótipos de EPHHL que estavam disponíveis no banco de sementes da Instituição. Os biótipos utilizados foram denominados de Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira, Vilhena e Suscetível, sendo oriundos dos municípios de Bom Sucesso do Sul (PR), Vitorino (PR) e Medianeira (PR), Vilhena (RO) e São Paulo (SP), respectivamente. A resistência

múltipla a inibidores da ALS e PROTOX já havia sido comprovada, previamente, nos biótipos originários de Vitorino e Bom Sucesso do Sul (TREZZI et al., 2005). Os biótipos originários de Medianeira (PR) e Vilhena (RO) são suspeitos de resistência e o biótipo de São Paulo é comprovadamente suscetível (TREZZI et al., 2011a)

Para os experimentos, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, por 5 minutos, e álcool a 50%, por 1 minuto. As sementes dos biótipos foram pré-germinadas em caixas gerbox contendo folhas de papel germitest, em BOD, com temperatura média de 25 °C e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/horas de escuridão e quando as plântulas atingiram 3 a 5 cm foram transplantadas para vasos com volume de 5 dm<sup>3</sup>, preenchidos com solo da Área Experimental da UTFPR, os quais foram peneirados e corrigidos nutricionalmente de acordo com os resultados da análise de solo (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Análise química do solo utilizado para semeadura dos biótipos de EPHHL nos ensaios de curvas de dose resposta. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

<b>pH</b>	<b>Ca</b>	<b>Cl<sub>2</sub></b>	<b>MO</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al<sup>+3</sup></b>	<b>SB</b>	<b>V</b>
			gdm <sup>-3</sup>	mgdm <sup>-3</sup>			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			%
4,9			71,03	17,32	0,53	4,71	2,65	0,08	7,89	61,16

Os dois experimentos foram realizados simultaneamente, no período 22 de abril a 27 de maio de 2013. Os herbicidas foram aplicados sobre plantas com duas folhas verdadeiras, no dia 06 de maio de 2013, utilizando pulverizador a pressão constante de CO<sub>2</sub>, com bicos leque 110.02 e volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. Nos momentos do início e término da aplicação foram registradas a temperatura e a umidade relativa do ar, e as condições ambientais no início e final das aplicações foram as seguintes: temperatura do ar = 18,5 e 21,2°C; umidade relativa do ar = 67 e 60%.

No primeiro experimento utilizou-se o biótipo S de EPHHL, oriundo de São Paulo. Para a variável controle, os tratamentos foram arranjos em um fatorial 5 x 7, sendo o fator herbicidas inibidores da PROTOX [fomesafen (difeniléteres), flumiclorac (ftalamidas), carfentrazone (triazolinonas), oxadiazon (oxadiazol) e saflufenacil (pirimidinedione)], e o fator concentrações dos herbicidas, utilizando-se as mesmas proporções da dose comercial (x) utilizadas no experimento com inibidores da ALS (Capítulo 01 da dissertação), sendo estas: 0x, 0,1x, 0,16x, 0,26x, 0,41x, 0,66x e 1x, correspondentes às concentrações de 0, 25, 40, 64, 102, 164, 250

g i.a.ha<sup>-1</sup> de fomesafen; 0, 6, 10, 15, 25, 39 e 60 g i.a.ha<sup>-1</sup> de flumiclorac, de 0, 3, 5, 8, 12, 20 e 30 g i.a.ha<sup>-1</sup> de carfentrazone, 0, 100, 160, 256, 410, 655 e 1000 g i.a.ha<sup>-1</sup> de oxadiazon e 0, 4, 6, 9, 14, 23 e 35 g i.a.ha<sup>-1</sup> de saflufenacil.

O segundo experimento foi realizado com os biótipos de EPHHL R ou com suspeita de R a ALS/PROTOX. Os tratamentos deste segundo experimento foram arranjos em fatorial 4 x 5 x 7, sendo, respectivamente, o fator biótipos (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena), herbicidas (os mesmos utilizados para o experimento do biótipo S) e concentrações dos herbicidas, sendo que para os biótipos R, as sete proporções da dose comercial utilizadas foram: 0x, 1x, 1,8x, 3,1x, 5,4x, 9,4x e 16,4x, correspondentes às concentrações de 0, 250, 438, 766, 1340, 2345 e 4103 g i.a.ha<sup>-1</sup> de fomesafen, 0, 60, 105, 184, 322, 563 e 985 g i.a.ha<sup>-1</sup> de flumiclorac, 0, 30, 53, 92, 161, 281 e 492 g i.a.ha<sup>-1</sup> de carfentrazone, de 0, 1000, 1750, 3063, 5359, 9379 e 16413 g i.a.ha<sup>-1</sup> de oxadiazon, e de 0, 35, 61, 107, 188, 328 e 574 g i.a.ha<sup>-1</sup> de saflufenacil. Para o fomesafen, adicionou-se espalhante adesivo não iônico/aniônico (ENERGIC), na concentração de 0,2% v/v. Para o carfentrazone adicionou-se 0,5% de óleo mineral (ASSIST), para o flumiclorac adicionou-se óleo mineral (ASSIST) na concentração de 0,2%v/v. E para o saflufenacil adicionou-se adjuvante não iônico (DASH HC) 0,5%v/v.

#### 3.4.1 Avaliações e Análises Estatísticas

Aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA), foram realizadas avaliações visuais do controle, através de uma escala, em que 0% representa a ausência de controle e 100% a morte das plantas (FRANS et al.,1986).

Nos mesmos períodos que foram realizadas as avaliações de controle visual, foram registradas imagens através de câmara digital, delimitando-se a área fotografada com um quadrado metálico de 25 cm de lado, forrado com TNT preto. No centro deste, foi cortado um círculo de mesmo diâmetro dos vasos, para evitar imagens além das plantas de interesse. As imagens digitais foram processadas com o programa "Image J", utilizando-se o separador de cores e outros procedimentos para converter a área vegetal verde em pixels. Foi computada a proporção de pixels brancos em relação à quantidade total de pixels da imagem.

Aos 21 DAA, foi determinada a massa da parte aérea verde (MPAV) imediatamente após a coleta das partes aéreas das plantas e, posteriormente, a



massa da parte aérea seca (MPAS) após secagem em estufa a 60 °C, até atingir massa constante.

Os dados de controle foram transformados para 100 – controle (%) e submetidos à análise da variância, pelo teste F ( $P < 0,05$ ). As relações entre variáveis dependentes e as concentrações de herbicidas foram ajustadas através do modelo de regressão não linear, empregando-se o modelo logístico de três parâmetros (Equação 1) com auxílio do programa computacional SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2010):

$$y = \frac{a}{1 + ab \left[ \frac{x}{x_0} \right]^b} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $y$  = Variável dependente;  $a$  = assíntota máxima;  $x$  = concentração do herbicida;  $x_0$  = concentração que proporciona 50% de controle;  $b$  = declividade da curva.

Com os valores das médias calculou-se o erro padrão da média, através do quociente entre o desvio padrão e a raiz quadrada do tamanho da amostra.

Também foram calculadas as doses necessárias para proporcionar controle de 50 e 80% ( $C_{50}$  e  $C_{80}$ ) e redução de 50 e 80% da MPAV e MPAS ( $GR_{50}$  e  $GR_{80}$ ), através do programa Microsoft Excel. Os fatores de resistência (FR) foram calculados pelo quociente entre os  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  dos biótipos R e S.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o experimento com o biótipo S, houve significância da interação herbicida x dose para as variáveis controle pela avaliação visual e controle pela avaliação de imagens, em todas as épocas avaliadas e também para massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS).

Para o experimento com os biótipos R, houve significância da interação biótipo x herbicida x dose para as variáveis controle pela avaliação visual, em todas as épocas avaliadas e MPAV. Para a variável MPAS houve significância das interações biótipo x dose, biótipo x herbicida e para herbicida x dose. Para o controle

pela avaliação de imagens, aos 7 DAA, houve significância da interação biótipo x herbicida x dose. Aos 14 DAA, houve significância da interação de biótipo x herbicida. E aos 21 DAA houve significância da interação de herbicida x dose e biótipo x herbicida

### 3.5.1 Controle

Em ambos os experimentos observou-se aumento dos níveis de controle com o decorrer do tempo e com a elevação da dose dos herbicidas, com valores significativamente maiores para o biótipo S em relação ao R (Figuras 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Os níveis máximos de controle do biótipo S com a dose recomendada dos inibidores da PROTOX (1x), nos três períodos de avaliação (7, 14 e 21 DAA), foram 65% (saflufenacil), 83% (saflufenacil) e 100 % (oxadiazon), respectivamente (Figura 3.1, A, B e C).

No biótipo S, observou-se que os níveis de controles foram altos, sendo superiores a 65% aos 21 DAA (Figura 3.1 C). Os herbicidas flumiclorac e fomesafen apresentaram controles inferiores aos obtidos com o saflufenacil, oxadiazon e carfentrazone. No entanto, a utilização da dose comercial (1x) dos cinco herbicidas testados permitiu confirmar a suscetibilidade do biótipo S aos inibidores da PROTOX. Um controle de 65% reflete injúria pronunciada, com a morte de plantas da população, segundo a escala de controle de Frans et al. (1986).

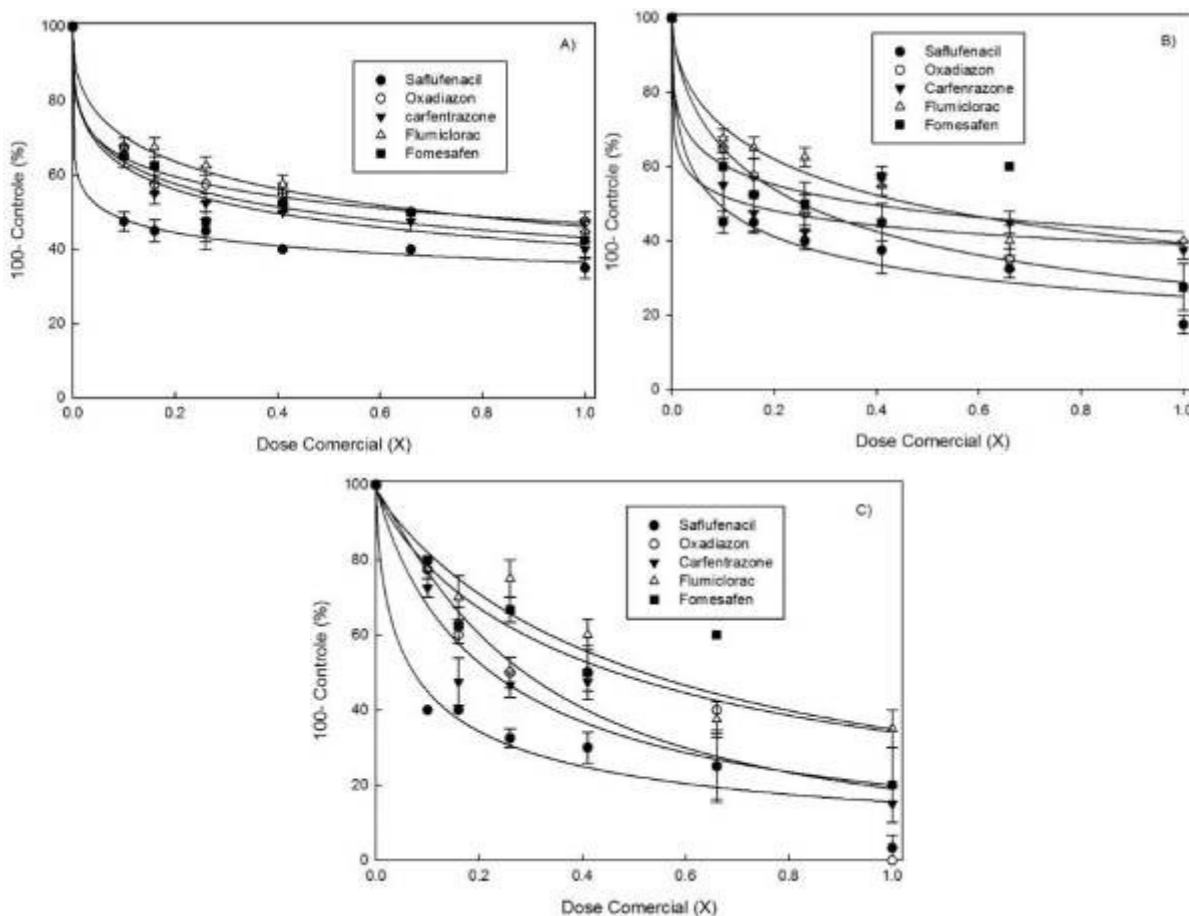


Figura 3.1 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Suscetível de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.2. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Aos 7 DAA, os valores de  $C_{50}$  do biótipo S (Tabela 3.2), variaram de 2,4 (saflufenacil) até 685,6 (oxadiazon) e os  $C_{80}$  foram superiores as doses máximas recomendadas. Aos 14 DAA os  $C_{50}$  variaram de 3,2 (saflufenacil) até 253,7 (oxadiazon) e os  $C_{80}$  foram superiores as doses máximas recomendadas. Aos 21 DAA, os valores de  $C_{50}$  variaram de 2,6 (saflufenacil) até 293,9 (oxadiazon), e os  $C_{80}$  variaram de 30 (carfentrazone) até valores superiores as doses máximas recomendadas (flumiclorac e fomesafen).

Tabela 3.2 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Suscetível aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>		
7	Saflufenacil	100	0,21	2,4	0,99	2,4	>35
	Oxadiazon	100	0,31	685,6	0,99	685,6	>1000
	Carfentrazone	100	0,37	11,6	0,99	11,6	>30
	Flumiclorac	100	0,44	42,8	0,99	42,8	>60
	Fomesafen	100	0,36	116,8	0,98	116,8	>250
14	Saflufenacil	100	0,46	3,2	0,98	3,2	>35
	Oxadiazon	100	0,66	253,7	0,99	253,7	>1000
	Carfentrazone	100	0,23	4,3	0,99	4,3	>30
	Flumiclorac	100	0,57	28,5	0,99	28,5	>60
	Fomesafen	100	0,32	96,1	0,90	96,1	>250
21	Saflufenacil	100	0,65	2,6	0,98	2,6	21,7
	Oxadiazon	99	1,17	293,9	0,94	293,9	950
	Carfentrazone	100	0,93	6,7	0,97	6,7	30
	Flumiclorac	98	0,96	32,3	0,97	31,3	>60
	Fomesafen	99	0,86	118,6	0,91	116,3	>250

<sup>1</sup> Equação logística de 3 parâmetros  $f = a/(1+abs(x/x_0)^b)$ ; A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva. C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. \* Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\* Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para os biótipos R, o controle exercido pelos herbicidas testados na dose comercial (1x) chegou ao máximo de 62,5% de controle (Figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Para o biótipo Medianeira, os níveis máximos de controle obtidos com a dose comercial (1x) aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.2 A, B e C) foram de 40% (saflufenacil), 52,5% (carfentrazone) e 50% (saflufenacil, oxadiazon e carfentrazone), respectivamente. Com a maior dose testada (16,4x), os controles máximos obtidos aos 7, 14 e 21 DAA, foram 65% (saflufenacil), 100% (saflufenacil) e 100% (saflufenacil, oxadiazon e flumiclorac), respectivamente.

Os níveis de controle obtidos com a dose comercial (1x) foram muito baixos, o que indica resistência. O melhor controle foi obtido com o saflufenacil, seguido de flumiclorac, oxadiazon, fomesafen e carfentrazone.

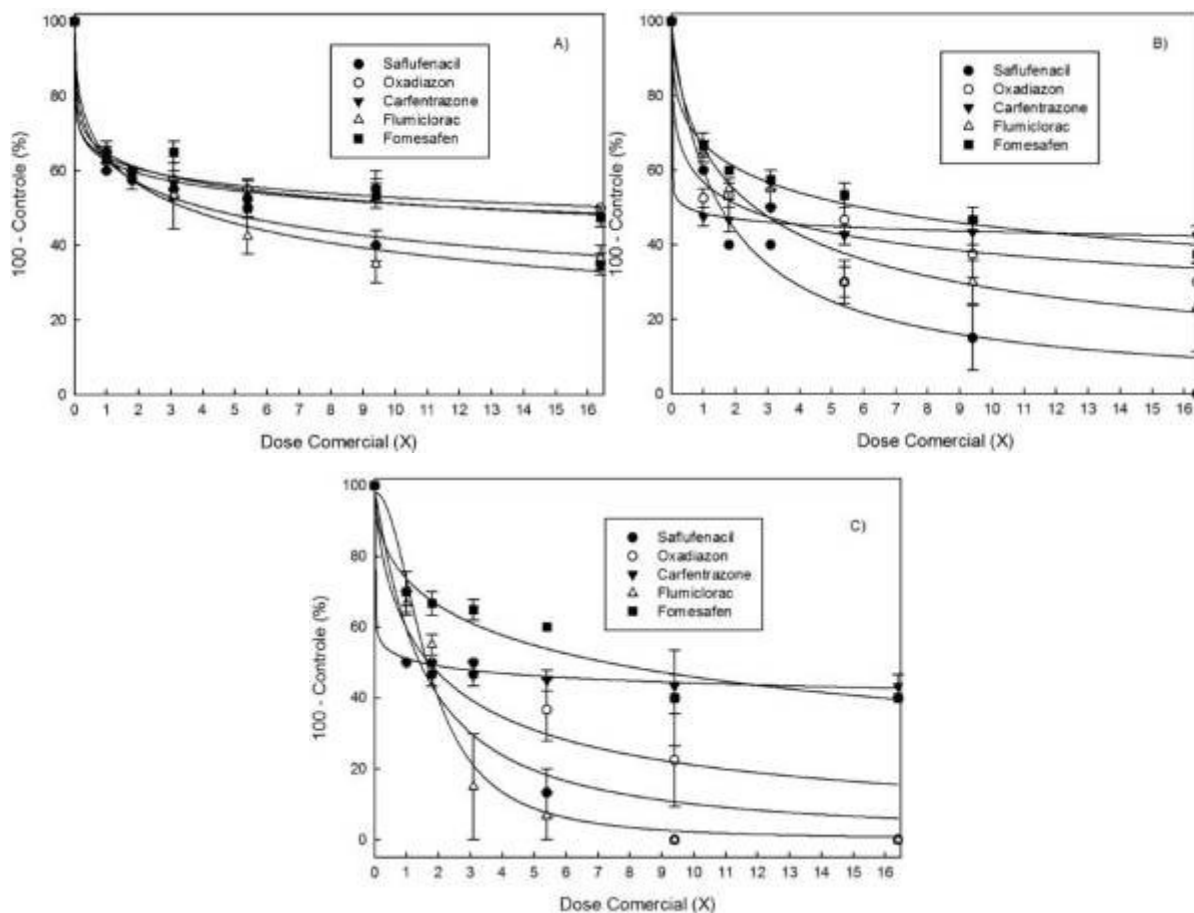


Figura 3.2 - Controle [100 - Controle (%)]do biótipo Medianeira de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.3. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Observou-se a tendência de diminuição dos valores de  $C_{50}$  e de  $C_{80}$  do biótipo Medianeira com o decorrer do período de avaliação (Tabela 3.3). Aos 7 e 14 DAA, os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  foram superiores aos obtidos aos 21 DAA, esta tendência sendo explicada pela evolução dos níveis de controle com o passar do tempo. Aos 7 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 145,6 (saflufenacil) até acima da dose máxima utilizada (oxadiazon). Os  $C_{80}$  neste período foram superiores as doses máximas utilizadas (16,4x). Aos 14 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 15 (carfentrazone) até acima da dose máxima utilizada (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 236 (saflufenacil) até acima da dose máxima utilizada (oxadiazon, carfentrazone, flumiclorac e fomesafen). Aos 21 DAA os  $C_{50}$  variaram de 44,2 (carfentrazone) até 1825 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 191 (flumiclorac) até acima da dose máxima utilizada (carfentrazone e fomesafen)

Os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, apresentados pelo biótipo Medianeira foram 32,2 (carfentrazone), 16,9 (saflufenacil) e 19,3 (saflufenacil),

respectivamente (Tabela 3.3), enquanto que os menores FR's para os mesmos períodos foram, 4,9 (flumiclorac), 3,5 (carfentrazone) e 3,1 (flumiclorac).

Tabela 3.3 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Medianeira aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,38	145,6	0,99	145,6	>574	6
	Oxadiazon	100	0,19	>16413	0,99	>16413	>16413	26,3
	Carfentrazone	100	0,21	373,3	0,99	373,3	>492	32,2
	Flumiclorac	100	0,46	209,6	0,99	209,6	>985	4,9
	Fomesafen	100	0,24	3086,7	0,98	3086,7	>4103	26,4
14	Saflufenacil	100	0,94	54,37	0,98	53,9	236	16,9
	Oxadiazon	100	0,34	2267,3	0,99	2250	>16413	8,9
	Carfentrazone	100	0,09	15,2	0,99	15	>492	3,5
	Flumiclorac	100	0,69	157,1	0,98	156,6	>985	5,5
	Fomesafen	100	0,40	>4103	0,99	>4103	>4103	15,5
21	Saflufenacil	98	1,13	51,2	0,96	49,7	172	19,3
	Oxadiazon	99	0,75	1775,4	0,95	1710	10900	5,8
	Carfentrazone	100	0,12	44,2	0,99	44,2	>492	6,6
	Flumiclorac	98	2,11	100,6	0,99	98,40	191	3,1
	Fomesafen	100	0,52	1863,9	0,98	1825	>4103	15,7

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Vilhena, os controles máximos obtidos com a dose comercial aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.3 A, B e C) foram de 45,7% (carfentrazone), 53% (oxadiazon) e 60% (saflufenacil e oxadiazon), respectivamente. Com a dose 16,4x, os controles máximos aos 7, 14 e 21 DAA, foram 75% (saflufenacil), 100% (saflufenacil, carfentrazone e flumiclorac) e 100% (saflufenacil, carfentrazone, oxadiazon e flumiclorac), respectivamente. Aos 21 DAA, a dose correspondente a 3,1x dos herbicidas saflufenacil e oxadiazon e 9,1x de carfentrazone e flumiclorac foi suficiente para atingir níveis de controle de 100%. Em ordem crescente de controle, os herbicidas podem ser arranjados conforme segue: fomesafen < flumiclorac < carfentrazone < oxadiazon < saflufenacil.

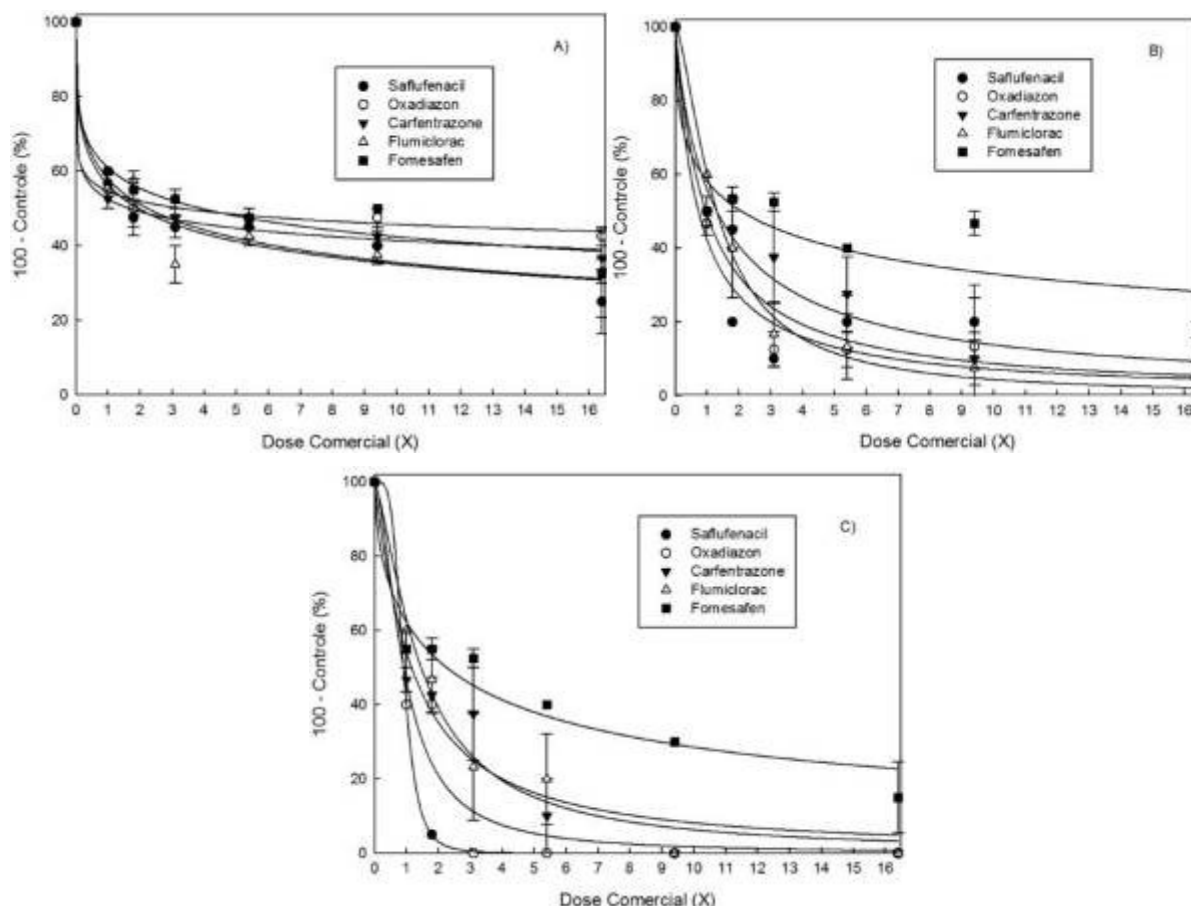


Figura 3.3 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Vilhena de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.4. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Aos 7 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 50,2 (carfentrazone) até 3292,4 (oxadiazon) (Tabela 3.4). Os  $C_{80}$  neste período foram superiores às doses máximas testadas (16,4x). Aos 14 DAA os  $C_{50}$  variaram de 25,5 (saflufenacil) até 962,3 (oxadiazon) e os  $C_{80}$  de 105 (saflufenacil) até acima das doses máximas testadas (fomesafen). Aos 21 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 31,8 (saflufenacil) até 915 (oxadiazon). Os  $C_{80}$  neste período variaram de 43,7 (saflufenacil) até acima das doses máximas testadas (fomesafen). Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  chamam atenção pelos elevados valores, no entanto estes são inferiores aos obtidos no biótipo Medianeira (Tabela 3.3) e muito superior aos encontrados com o biótipo S (Tabela 3.2).

No biótipo Vilhena, os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA foram 28,6 (saflufenacil), 9,1 (carfentrazone) e 12,4 (saflufenacil), respectivamente (Tabela 3.4). Para todos os períodos o menor FR foi de 2,8 (flumiclorac aos 14 e 21 DAA).

Tabela 3.4 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Vilhena aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,38	68,6	0,99	68,6	>574	28,6
	Oxadiazon	100	0,15	3292,4	0,99	3292,4	>16413	4,8
	Carfentrazone	100	0,19	50,2	0,99	50,2	>492	4,3
	Flumiclorac	100	0,40	132,8	0,97	133,8	>985	3,1
	Fomesafen	100	0,33	980,3	0,98	970	>4103	8,3
14	Saflufenacil	100	0,98	25,3	0,96	25,5	105	8
	Oxadiazon	100	1,01	962,3	0,98	962,3	3810	3,8
	Carfentrazone	99	0,91	39,9	0,98	39,3	183	9,1
	Flumiclorac	100	1,52	78,4	0,99	78,4	195,6	2,8
	Fomesafen	99	0,45	535,2	0,93	525	>4103	5,5
21	Saflufenacil	100	4,36	31,8	0,99	31,8	43,7	12,4
	Oxadiazon	99	1,70	920,5	0,97	915	2070	3,1
	Carfentrazone	99	1,13	35,4	0,98	34,8	120	5,2
	Flumiclorac	99	1,41	88,3	0,99	87,6	235	2,8
	Fomesafen	99	0,62	580,3	0,98	565	>4103	4,9

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Bom Sucesso do Sul, na dose comercial (1x), os controles máximos aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.4 A, B e C) foram 40% (oxadiazon e carfentrazone), 45% (oxadiazon) e 50% (oxadiazon), respectivamente. Com a maior dose (16,4x), os máximos controles aos 7, 14 e 21 DAA, foram 55% (carfentrazone e oxadiazon), 75% (oxadiazon) e 77,5% (oxadiazon), respectivamente.

O biótipo Bom Sucesso do Sul apresentou níveis de controle muito inferiores aos determinados nos biótipos Medianeira (Figura 3.2) e Vilhena (Figura 3.3). Enquanto o nível máximo de controle detectado em Bom Sucesso do Sul na dose 16,4x foi de 77,5%, nos biótipos Medianeira e Vilhena os controles máximos foram de 100%. Isto demonstra o alto nível de resistência deste biótipo em comparação a Medianeira e o Vilhena. Em ordem crescente de controle os herbicidas podem ser arranjados conforme segue: fomesafen < saflufenacil < carfentrazone < flumiclorac < oxadiazon.



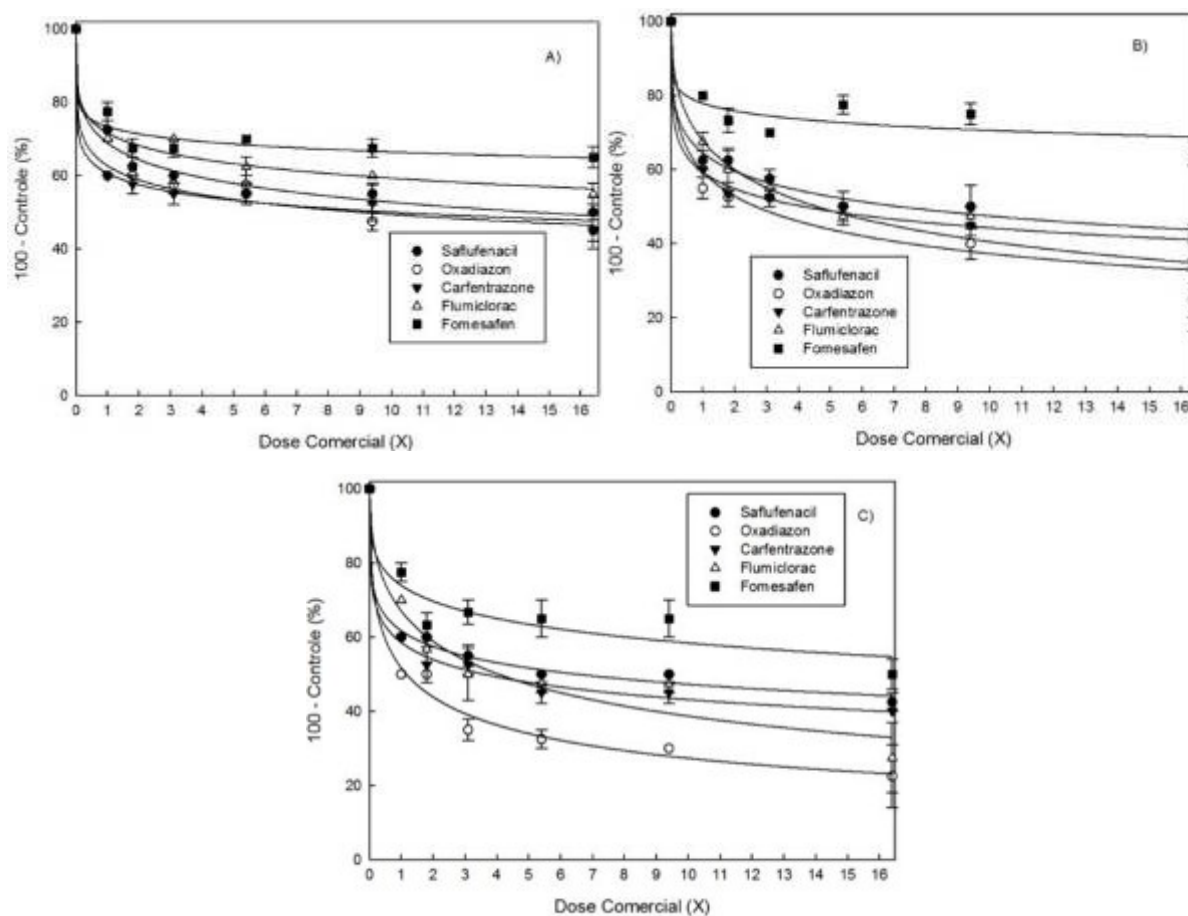


Figura 3.4 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Bom Sucesso do Sul de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.5. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Aos 7, 14 e 21 DAA, os menores  $C_{50}$  encontrados foram 300, 124,5 e 107,8 (carfentrazone), respectivamente. Os  $C_{80}$  (Tabela 3.5) foram elevados, sendo em geral superiores às doses máximas empregadas (16,4x). O biótipo Bom Sucesso do Sul apresentou os níveis mais altos de resistência, comparativamente aos demais.

Os menores  $FR's$  aos 7, 14 e 21 DAA foram de 13 (oxadiazon), 9,6 (flumiclorac) e 3,9 (oxadiazon), respectivamente. Os herbicidas que apresentaram os maiores  $FR's$  nestes mesmos períodos foram o fomesafen e o saflufenacil.

Tabela 3.5 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Bom Sucesso do Sul aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,30	503,5	0,99	507,5	>574	211,4
	Oxadiazon	100	0,24	9090,5	0,99	9000	>16413	13
	Carfentrazone	100	0,19	302,7	0,99	300	>492	25,9
	Flumiclorac	100	0,24	>985	0,99	>985	>985	67,3
	Fomesafen	100	0,14	>4103	0,98	>4103	>4103	2535,3
14	Saflufenacil	100	0,30	252	0,99	249,6	>574	78,4
	Oxadiazon	100	0,39	2719,3	0,98	2660	>16413	10,5
	Carfentrazone	100	0,26	125,3	0,99	124,5	>492	28,8
	Flumiclorac	100	0,49	276,2	0,99	273,6	>985	9,6
	Fomesafen	100	0,17	>4103	0,94	>4103	>4103	4834,8
21	Saflufenacil	100	0,25	228,8	0,99	228,8	>574	88,7
	Oxadiazon	100	0,45	1160	0,99	1160	>16413	3,9
	Carfentrazone	100	0,27	107,8	0,99	107,8	>492	16
	Flumiclorac	100	0,51	242,3	0,98	242,3	>985	7,8
	Fomesafen	100	0,31	>4103	0,96	>4103	>4103	65,6

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

A aplicação da dose comercial dos inibidores da PROTOX (1x) no biótipo Vitorino resultou em níveis de controle máximo de 42,5% (oxadiazon e carfentrazone), 55% (oxadiazon) e 62,5% (oxadiazon), respectivamente, aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.5 A, B e C). Com a maior dose (16,4x), os níveis máximos de controle aos 7, 14 e 21 DAA, foram 60% (flumiclorac), 77,5% (flumiclorac) e 100% (oxadiazon), respectivamente.

O biótipo Vitorino apresentou níveis de controle inferiores aos detectados nos biótipos Medianeira (Figura 3.2) e Vilhena (Figura 3.3), e níveis de controle superiores ao Bom Sucesso do Sul (Figura 3.4). Para o Medianeira e Vilhena o controle máximo na dose 16,4x foi 100% para ambos, enquanto no Bom Sucesso do Sul foi de 77,5% (oxadiazon) e o Vitorino foi de 100% (oxadiazon).

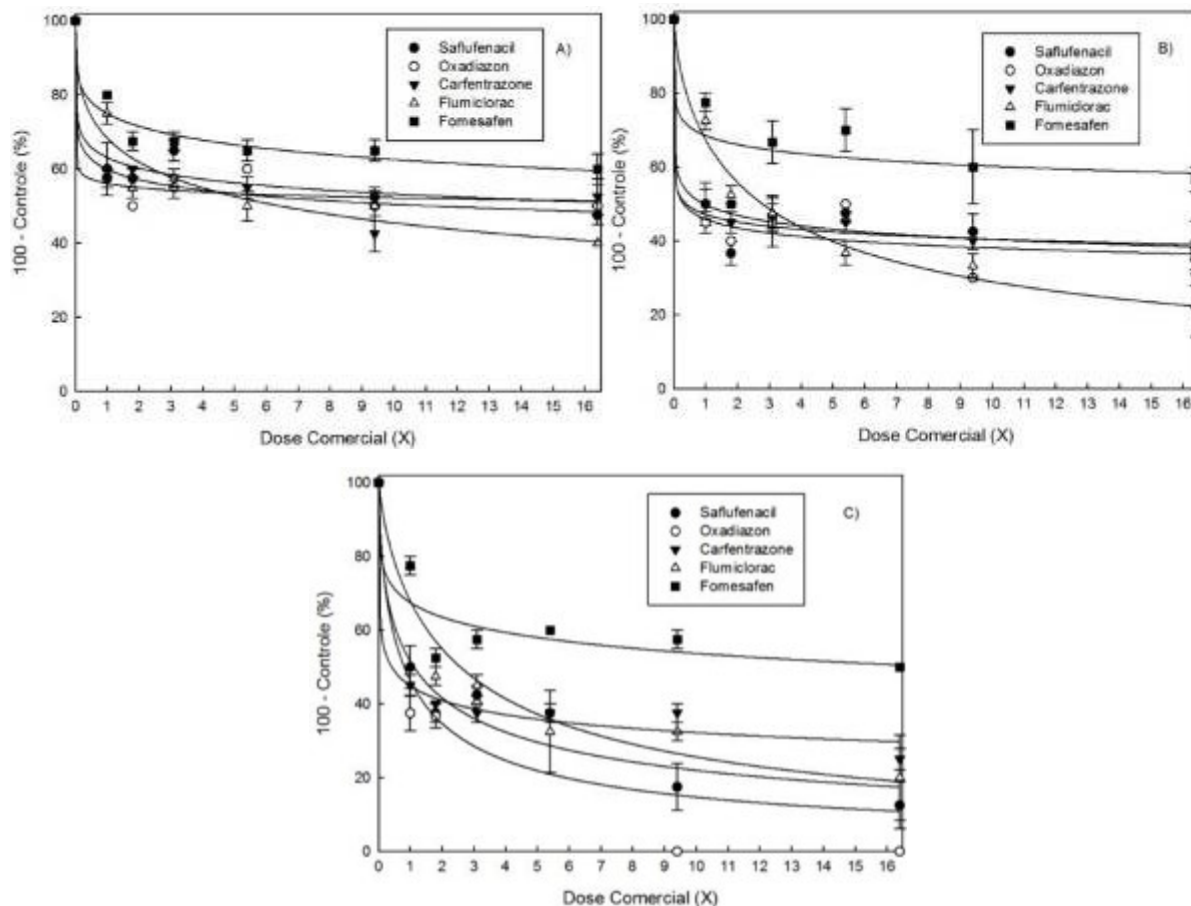


Figura 3.5 - Controle [100- Controle (%)]do biótipo Vitorino de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação de diferentes herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.6. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Aos 7, 14 e 21 DAA os  $C_{50}$  foram superiores a 333,9 (carfentrazone), 13,7 (saflufenacil) e 12,5 (carfentrazone), respectivamente (Tabela 3.6). Os  $C_{80}$  aos 7 e 14 DAA foram superiores às doses máximas utilizadas. Aos 21 DAA, os  $C_{80}$  variaram de 430,5 (saflufenacil) até superiores às doses máximas utilizadas (carfentrazone e fomesafen).

Os menores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, foram 9 (flumiclorac), 1,2 (oxadiazon) e 1,9 (carfentrazone), respectivamente, e os maiores FR's para estes períodos foram 306,1 (saflufenacil), 356,5 (fomesafen) e 38,7 (fomesafen).

Tabela 3.6 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter 50% e 80% de controle (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) para o biótipo Vitorino aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,18	>574	0,97	>574	>574	306,1
	Oxadiazon	100	0,07	>16413	0,98	>16413	>16413	54
	Carfentrazone	100	0,17	337,9	0,97	333,9	>492	28,8
	Flumiclorac	100	0,41	381,8	0,97	385,2	>985	9
	Fomesafen	100	0,25	>4103	0,98	>4103	>4103	162,7
14	Saflufenacil	100	0,12	13,7	0,98	13,7	>574	4,3
	Oxadiazon	100	0,14	310,2	0,97	310	>16413	1,2
	Carfentrazone	100	0,17	28,5	0,99	28,2	>492	6,5
	Flumiclorac	100	0,70	165,2	0,99	167,4	>985	5,9
	Fomesafen	100	0,16	>4103	0,86	>4103	>4103	356,5
21	Saflufenacil	100	0,58	39,3	0,98	38,9	430,5	15,1
	Oxadiazon	100	0,70	824	0,94	810	5900	2,8
	Carfentrazone	100	0,23	12,5	0,99	12,5	>492	1,9
	Flumiclorac	100	0,78	150,3	0,98	154,2	900	4,9
	Fomesafen	100	0,25	>4103	0,93	>4103	>4103	38,7

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose que proporciona controle de 50%. C<sub>80</sub>= Dose necessária para gerar 80% de controle. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

### 3.5.2 Massa da Parte Aérea Verde e Massa da Parte Aérea Seca

Todos os biótipos apresentaram reduções na massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS), com o aumento das doses dos herbicidas (Figuras 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10).

Os aumentos das doses dos herbicidas resultaram em grandes reduções de MPAV e MPAS do biótipo S, em relação à testemunha (Figura 3.6 A e B). A maior dose (1x) provocou reduções em MPAV (Figura 3.6 A) entre 51,3% (fomesafen) e 75,4% (carfentrazone), em relação à testemunha sem aplicação, e reduções na MPAS (Figura 3.6 B) entre 64% (saflufenacil) e 81% (fomesafen), que estão de acordo com os elevados níveis de controle obtidos com estes herbicidas na avaliação aos 21 DAA (Figura 3.1 C).

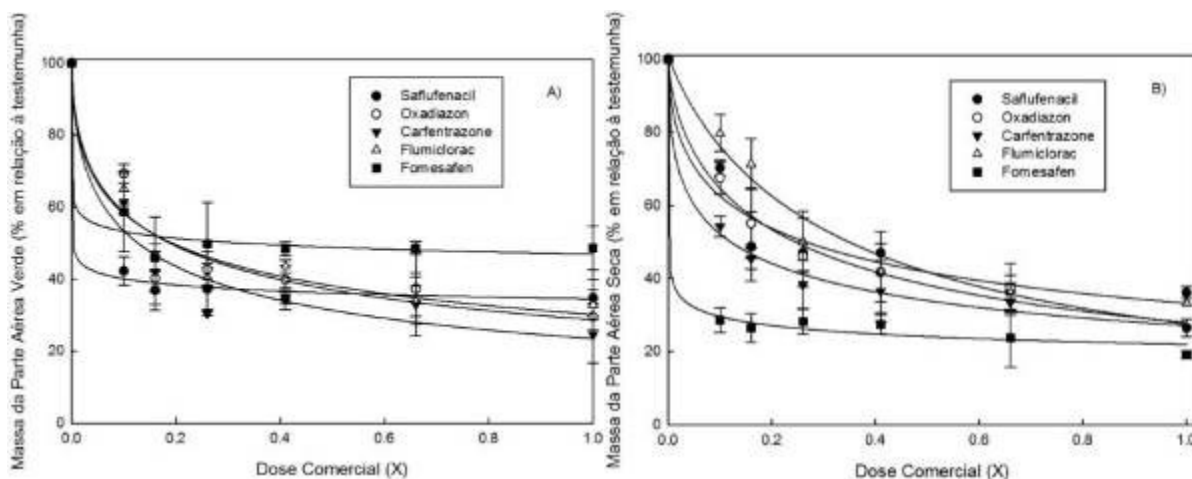


Figura 3.6 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Suscetível, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.7. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os valores de  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  são inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 3.2), isto explicado pelas reduções severas da MPAV e MPAS já nas primeiras doses dos herbicidas (Tabela 3.7). Para a MPAV o maior  $GR_{50}$  foi 189 (oxadiazon) e os  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas. Já para a MPAS o maior  $GR_{50}$  foi de 245 (oxadiazon) e os  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) do biótipo Suscetível. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>		
Massa da parte aérea verde – MPAV	Saflufenacil	100	0,10	0,1	0,99	0,1	>35
	Oxadiazon	100	0,54	185,9	0,96	189	>1000
	Carfentrazone	100	0,57	3,8	0,98	3,8	>30
	Flumiclorac	100	0,51	11,4	0,98	11,6	>60
	Fomesafen	100	0,11	81,7	0,98	81,7	>250
Massa da parte aérea seca – MPAS	Saflufenacil	100	0,52	9,2	0,98	9,3	>35
	Oxadiazon	100	0,67	243,8	0,99	245	>1000
	Carfentrazone	100	0,47	3,6	0,99	3,6	>30
	Flumiclorac	101	0,91	20,4	0,98	20,9	>60
	Fomesafen	100	0,17	0,2	0,99	0,2	>250

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Medianeira (Figura 3.7 A e B), foram constatadas reduções de MPAV em relação à testemunha, entre 44,4% (carfentrazone) e 73% (flumiclorac) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 62% (carfentrazone) e 90% (flumiclorac).

As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 24% (oxadiazon) e 79% (flumiclorac). Na dose de 16,4x as reduções em relação à testemunha variaram entre 67% (oxadiazon) e 89,4% (flumiclorac).

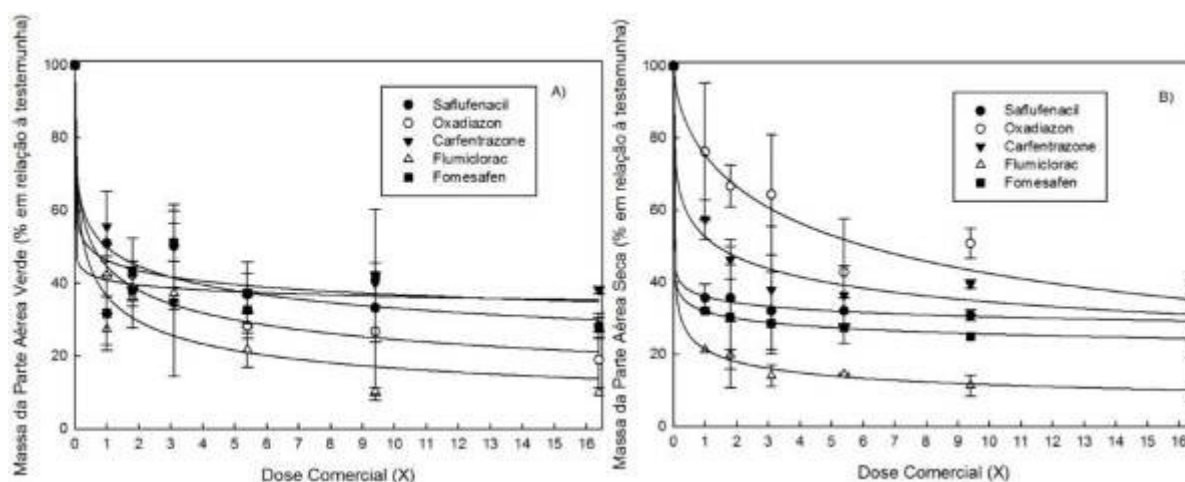


Figura 3.7 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Medianeira, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.8. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $GR_{50}$ ,  $GR_{80}$  e FR da MPAV e MPAS são descritos na Tabela 3.8. Os valores são inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 3.3) devido à alta redução de MPAV e MPAS em relação à testemunha, já nas primeiras doses utilizadas. Para a MPAV, o maior  $GR_{50}$  foi 584 (oxadiazon) e os maiores  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas (saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone e fomesafen). Para a MPAS, o maior  $GR_{50}$  foi de 6100 (oxadiazon) e os maiores  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas (saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone e fomesafen) (Tabela 3.8).

Os FR's para a MPAV variaram entre 0,04 (fomesafen) até 474,9 (saflufenacil), enquanto para a MPAS variaram entre 0,02 (saflufenacil) até 24,9 (oxadiazon). Os valores de FR baixos para fomesafen e saflufenacil se justificam porque os  $GR_{50}$  para a MPAV e MPAS no biótipo suscetível foram elevados em relação ao biótipo Medianeira, ou seja, estes herbicidas apresentaram menor eficiência em reduzir a MPAV e MPAS do biótipo suscetível, comparativamente ao resistente. Observa-se que os FR's da MPAV e MPAS, em geral foram mais baixos que os do controle (Tabela 3.3).

Considerando-se apenas a variável MPAS, pode-se afirmar que existe a resistência cruzada do biótipo Medianeira aos grupos químicos das difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas e oxadiazol, mas não ao grupo pirimidinedione. No entanto, a análise da variável controle e seus FR's confirma a resistência do biótipo Medianeira aos herbicidas saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone, flumiclorac e fomesafen, caracterizando a resistência cruzada aos grupos químicos dos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione.

Tabela 3.8 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Medianeira. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Saflufenacil	100	0,30	34,9	0,98	34,9	>574	474,9
	Oxadiazon	100	0,39	584	0,99	584	>16413	3,1
	Carfentrazone	100	0,17	12,7	0,97	12,7	>492	3,3
	Flumiclorac	100	0,46	18,2	0,97	18,2	372	1,6
	Fomesafen	100	0,08	3,1	0,95	3,1	>4103	0,04
Massa da parte aérea seca – MPAS	Saflufenacil	100	0,11	0,2	0,99	0,2	>574	0,02
	Oxadiazon	100	0,61	6062,7	0,97	6100	>16413	24,9
	Carfentrazone	100	0,32	41,2	0,99	41,7	>492	11,6
	Flumiclorac	100	0,32	1	0,99	1	79	0,1
	Fomesafen	100	0,13	0,9	0,99	0,9	>4103	5

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Vilhena (Figura 3.8 A e B), foram constatadas reduções de MPAV elevadas, relativamente à testemunha, entre 79,5% (saflufenacil) e 91% (carfentrazone) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 87% (fomesafen) e 95,2% (flumiclorac).

As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 72,8% (oxadiazon) e 85,9% (flumiclorac). Na dose de 16,4x as reduções da MPAS em relação à testemunha variaram entre 80% (oxadiazon) e 92,3% (carfentrazone).

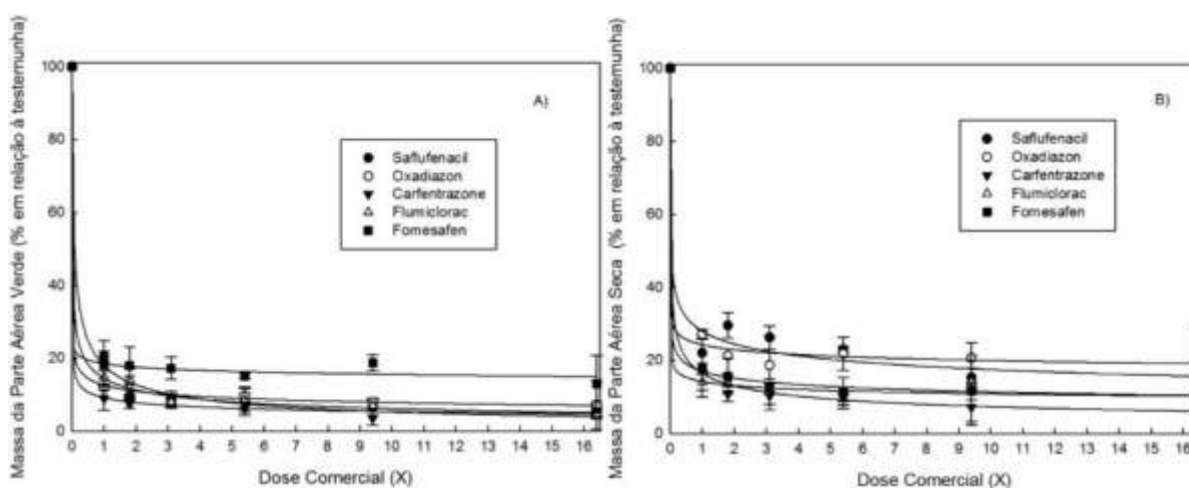


Figura 3.8 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vilhena, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o



erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.9. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  do biótipo Vilhena (Tabela 3.9) foram inferiores aos  $C_{50}$  e  $C_{80}$  (avaliações de controle) (Tabela 3.4). Para a MPAV o maior  $GR_{50}$  foi de 2,7 (saflufenacil) e o maior  $GR_{80}$  foi 88 (oxadiazon). Na MPAS o maior  $GR_{50}$  foi 0,9 (saflufenacil) e o maior  $GR_{80}$  foi 10000 (oxadiazon) (Tabela 3.9).

Os FR's para a MPAV variaram entre  $<0,0001$  (fomesafen) e 36,8 (saflufenacil), enquanto para a MPAS variaram entre  $<0,0001$  (flumiclorac e oxadiazon) e 0,6 (fomesafen). Os FR da MPAV e MPAS foram mais baixos que os observados nas avaliações de controle (Tabela 3.4).

Considerando apenas a avaliação da MPAS, o biótipo de Vilhena não pode ser considerado resistente a nenhum dos inibidores da PROTOX. No entanto, quando se considera, também, a variável controle e os respectivos FR's é confirmada a resistência cruzada aos grupos químicos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione para esse biótipo.

Tabela 3.9 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vilhena. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Saflufenacil	100	0,59	2,7	0,99	2,7	28	36,8
	Oxadiazon	100	0,23	0,2	0,99	0,2	88	0,001
	Carfentrazone	100	0,25	<0,001	0,99	<0,001	0,7	0,001
	Flumiclorac	100	0,41	0,77	0,99	0,77	23,1	0,07
	Fomesafen	100	0,09	<0,001	0,99	<0,001	87,5	<0,0001
Massa da parte aérea seca – MPAS	Saflufenacil	100	0,26	0,9	0,99	0,9	189	0,1
	Oxadiazon	100	0,11	0,03	0,99	0,03	10000	<0,0001
	Carfentrazone	100	0,39	0,5	0,99	0,5	16,5	0,14
	Flumiclorac	100	0,13	<0,001	0,99	<0,001	2,8	<0,0001
	Fomesafen	100	0,20	0,1	0,99	0,1	95	0,6

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Bom Sucesso do Sul (Figura 3.9 A e B), foram constatadas reduções de MPAV em relação à testemunha, entre 34% (saflufenacil) e 83% (flumiclorac) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 52,3% (carfentrazone) e 93,4% (flumiclorac).

As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 39% (carfentrazone) e 79,8% (flumiclorac). Na dose de 16,4x as reduções em relação à testemunha variaram entre 60,6% (carfentrazone) e 86,6% (flumiclorac).

Com a dose 1x, o biótipo S, obteve em relação à testemunha, reduções de MPAV e MPAS superiores a 51,3% e 64%, respectivamente, demonstrando a grande diferença deste para com o biótipo S. Comparativamente aos biótipos Medianeira e Vilhena, a aplicação da dose comercial dos herbicidas (1x) nas plantas do biótipo Bom Sucesso do Sul provocou menores reduções da MPAV e MPAS, em relação à testemunha.

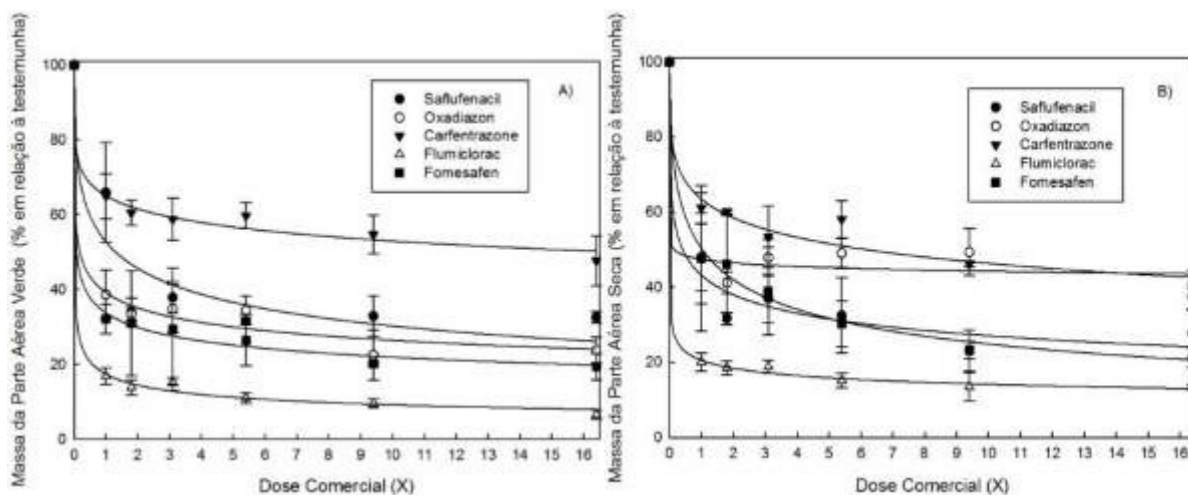


Figura 3.9 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Bom Sucesso do Sul, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.10. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  do biótipo Bom Sucesso do Sul (Tabela 3.10) foram inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 3.5). Para a MPAV, o maior  $GR_{50}$  foi superior a dose máxima utilizada (carfentrazone) e os maiores  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas (saflufenacil, oxadiazon e carfentrazone). Para a variável MPAS, o maior  $GR_{50}$  foi de 260,6 (fomesafen) e os maiores  $GR_{80}$  foram superiores as doses máximas utilizadas (saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone e fomesafen) (Tabela 3.10).

Os  $FR$ 's para a MPAV variaram entre 0,04 (flumiclorac) e 623,8 (saflufenacil), enquanto para a MPAS variaram entre 0,003 (flumiclorac) e 1489,3 (fomesafen). Os  $FR$ 's da MPAV e MPAS foram inferiores aos observados no controle (Tabela 3.5).

Considerando-se apenas os valores de  $FR$  da MPAS se constata que este biótipo apresenta resistência cruzada apenas aos grupos químicos difeniléteres, triazolinonas e pirimidinedione, porém não apresenta resistência às ftalamidas e oxadiazol. Porém, os dados de controle e  $FR$ 's correspondentes comprovam a existência de resistência cruzada a todos os grupos químicos testados para esse biótipo. Os níveis de resistência foram superiores aos constatados nos biótipos Medianeira e Vilhena.

Trezzi et al. (2011a), utilizando uma técnica de imersão foliar obtiveram valores de  $FR$  da variável controle com os herbicidas fomesafen, lactofen e carfentrazone (inibidores da PROTOX) para este mesmo biótipo, variando entre 2,8

e 204,7. E os valores de FR para MV variaram entre 10,7 e 19,2 e de MS variaram entre 3,2 e 8,4. Estes dados confirmam que a variável resposta pode influenciar no FR e o FR da MS são, em geral, menores que os obtidos pela MV e pelo controle.

Tabela 3.10 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Bom Sucesso do Sul. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Saflufenacil	100	0,41	45	0,95	45,9	>574	623,8
	Oxadiazon	100	0,25	178,6	0,99	178,6	>16413	0,9
	Carfentrazone	100	0,22	>492	0,99	>492	>492	136,5
	Flumiclorac	100	0,32	0,4	0,99	0,4	34,8	0,04
	Fomesafen	100	0,26	18,5	0,99	18,5	3950	0,2
Massa da parte aérea seca – MPAS	Saflufenacil	100	0,31	14,6	0,99	14,58	>574	1,6
	Oxadiazon	100	0,06	159	0,98	159	>16413	0,6
	Carfentrazone	100	0,30	187,4	0,98	186	>492	51,6
	Flumiclorac	100	0,20	0,06	0,99	0,06	72	0,003
	Fomesafen	100	0,49	260,6	0,99	260,6	>4103	1489,3

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

No biótipo Vitorino (Figura 3.10 A e B), foram constatadas reduções de MPAV relativamente à testemunha, entre 17,5% (fomesafen) e 87,4% (oxadiazon) com a utilização da dose comercial (1x) dos herbicidas. Na maior dose (16,4x), as reduções da MPAV em relação à testemunha variaram entre 82,6% (fomesafen) e 96,3% (flumiclorac). As reduções na MPAS provocadas pela dose 1x variaram entre 47% (fomesafen) e 84% (saflufenacil). Na dose de 16,4x as reduções em relação à testemunha variaram entre 83,2% (fomesafen) e 92% (saflufenacil).

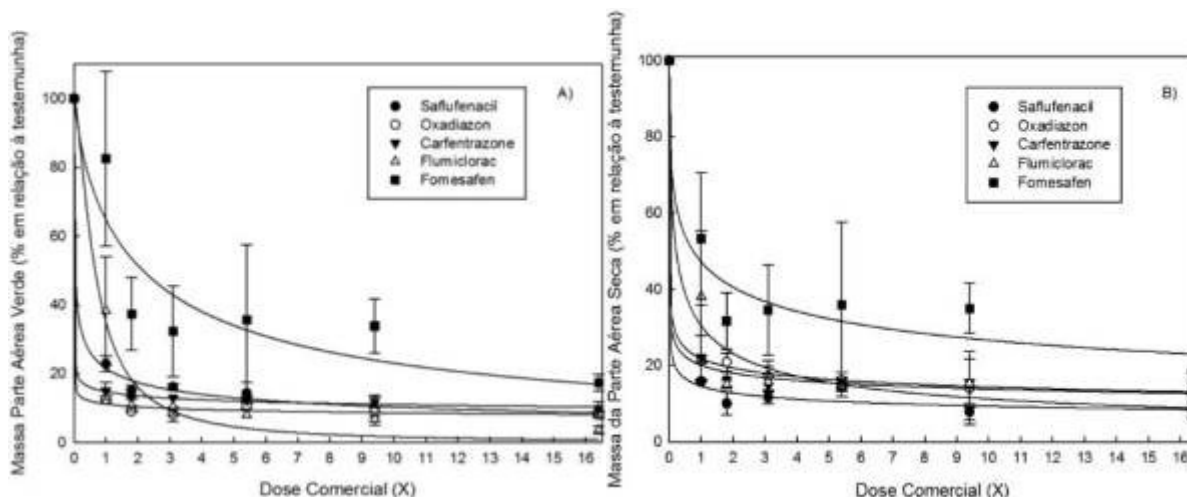


Figura 3.10 - Massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) (% em relação à testemunha) do biótipo Vitorino, em resposta a aplicação dos herbicidas. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.11. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Os  $GR_{50}$  e  $GR_{80}$  do biótipo Vitorino (Tabela 3.11), também foram inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 3.6). Para a MPAV o maior  $GR_{50}$  foi 537,5 (fomesafen) e o maior  $GR_{80}$  foi 3150 (fomesafen). Na MPAS o maior  $GR_{50}$  foi 188,1 (fomesafen) e o  $GR_{80}$  para o fomesafen foi superior à dose máxima utilizada (>4103) (Tabela 3.11).

Os  $FR$ 's para a MPAV variaram entre <0,001 (oxadiazon e carfentrazone) e 15,9 (saflufenacil), enquanto para a MPAS variando entre 0,001 (saflufenacil) e 1074,9 (fomesafen). Os  $FR$ 's da MPAV e MPAS foram inferiores aos observados no controle (Tabela 3.6).

Considerando-se os  $FR$ 's da MPAS, constata-se que o biótipo Vitorino apresenta resistência apenas ao grupo químico dos difeniléteres, porém não apresenta resistência às ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione. No entanto, os níveis de controle e  $FR$ 's do biótipo Vitorino comprovam existência da resistência cruzada aos grupos químicos dos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione. Em termos gerais, o biótipo Vitorino apresenta nível de resistência superior aos biótipos Medianeira e Vilhena e nível de resistência inferior ao Bom Sucesso do Sul.

A correlação dos valores estimados de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  dos cinco biótipos testados e de todas as variáveis avaliadas realizada através dos softwares SigmaPlot 10.0 e Excel foram significativas, variando entre 0,98 e 1 ( $p < 0,05$ ), o que demonstra a equivalência dos métodos de cálculo adotados.

Tabela 3.11 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter redução de 50% e 80% da MPAV e da MPAS (GR<sub>50</sub> e GR<sub>80</sub>) e os fatores de resistência (FR) para o biótipo Vitorino. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Avaliação	Herbicida	Parâmetros				GR <sub>50</sub> **	GR <sub>80</sub> **	FR
		A	B	GR <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
Massa da parte aérea verde – MPAV	Saflufenacil	100	0,38	1,2	0,99	1,2	45,5	15,9
	Oxadiazon	100	0,12	<0,001	0,99	<0,001	4,6	<0,001
	Carfentrazone	100	0,14	<0,001	0,99	<0,001	2,4	<0,001
	Flumiclorac	100	1,50	39,7	0,99	39,7	100,5	3,4
Massa da parte aérea seca – MPAS	Fomesafen	101	0,78	515,6	0,93	537,5	3150	6,6
	Saflufenacil	100	0,22	0,01	0,99	0,01	5,95	0,001
	Oxadiazon	100	0,22	3,2	0,99	3,2	1700	0,01
	Carfentrazone	100	0,20	0,03	0,99	0,03	33	0,007
	Flumiclorac	100	0,54	12,9	0,98	12,9	171	0,6
	Fomesafen	100	0,39	188,1	0,97	188,1	>4103	1074,9

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, GR<sub>50</sub>= Dose que proporciona redução de 50% da MPAV ou MPAS. GR<sub>80</sub>= Dose que proporciona redução de 80% da MPAV ou MPAS. FR = GR<sub>50</sub> resistente/ GR<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Verifica-se que os FR's são variáveis, como já fora constatado na investigação de resposta a dose dos inibidores da ALS (Capítulo 01), variando segundo o herbicida utilizado, biótipo, condições de ambiente e variável mensurada. Assim, são encontrados na literatura valores distintos de FR em ensaios com EPHHL para inibidores da PROTOX, como no presente trabalho.

Trezzi et al.(2005) calcularam os FR's para os inibidores da ALS e da PROTOX dos biótipos Vitorino e Bom Sucesso do Sul. O FR para imazethapyr foi superior a 24 para o Vitorino, enquanto para o biótipo Bom Sucesso do Sul foi de 15. Os FR's para fomesafen foram de 62 (Vitorino) e 39 (Bom Sucesso do Sul). Portanto, estudos efetuados anteriormente com os biótipos Vitorino e Bom Sucesso do Sul confirmaram a resistência aos inibidores da ALS/PROTOX, mas a resistência nos biótipos Medianeira e Vilhena ainda não fora estudada. Os dados também confirmam a resistência desses dois biótipos a esses mecanismos de ação. Em outro estudo, com a aplicação de fomesafen nos mesmos biótipos de EPHHL, Trezzi et al. (2009 a) encontraram FR's de 1,4 a 2,1 para a variável controle.

Na literatura encontram-se dados de resistência aos inibidores da PROTOX para outras espécies daninhas. Shoup et al. (2003), observaram que o biótipo R de *Amaranthus rudis* foi aproximadamente 34, 82, 8 e 4 vezes mais resistente que o biótipo S, para o acifluorfen, lactofen, fomesafen e sulfentrazone,

respectivamente, confirmando a existência de resistência cruzada aos inibidores da PROTOX.

Para todos os biótipos testados no presente experimento observou-se a quebra da dominância da gema apical, o que provocou brotação de gemas laterais nas plantas, principalmente nas avaliações mais tardias (dados não apresentados). A detecção das brotações foi incorporada no momento da atribuição de notas de controle, o que auxilia no entendimento da resistência cruzada nos biótipos Medianeira, Vilhena, Bom Sucesso do Sul e Vitorino para todos os grupos químicos testados (difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione). Valores inferiores de FR para a variável MPAS, em comparação aos FR obtidos nas avaliações de controle podem ser explicados porque a avaliação visual de controle detecta pequenas porções de tecidos verdes que não foram mortos pela ação dos herbicidas, enquanto a MPAS considera os tecidos como um todo, podendo representar as porções de tecidos verdes desidratados apenas um pequeno percentual relativo, sendo pouco perceptíveis para a detecção de significância entre tratamentos. Sendo assim, a avaliação visual de controle pode ser uma variável mais confiável que a MPAS.

Colaborando com estas informações, foram observadas diferenças na MPAS e estatura entre as testemunhas do biótipo S e dos biótipos R (Medianeira, Vilhena, Bom Sucesso do Sul e Vitorino), sem o uso dos herbicidas (dados não apresentados). As testemunhas do biótipo S apresentaram menor desenvolvimento e com isso menor MPAS do que os biótipos R, o que corrobora com observações anteriormente feitas por Trezzi et al. (2009 b). Além disso, o biótipo S apresenta menor proporção folhas/ caule do que os R, com isso apresentando, proporcionalmente, maior peso da MPAS em comparação aos biótipos R, quando da aplicação das doses dos herbicidas. Assim, a relativização das matérias secas para 100 faz com que, na resposta do biótipo S aos herbicidas não se observe grande declividade da curva com o aumento das doses e com isso o  $GR_{50}$  do biótipo S fica maior, o que reduz os valores de FR para MPAS dos biótipos R testados. Os biótipos R têm mais folhas, que proporcionalmente contém menos matéria seca que os caules, o que aumenta a declividade da curva, contribuindo para redução dos valores de FR.

Assim, por se julgar que a variável controle expressa melhor a resposta biológica das plantas aos inibidores da PROTOX do que as variáveis MPAV e MPAS,

a mesma será utilizada para fins de confirmação de resistência neste trabalho. Sendo assim, todos os biótipos apresentam resistência cruzada a todos os grupos químicos dos inibidores da PROTOX testados, isto sendo fortemente confirmada pela análise dos níveis de controle e pelos FR obtidos.

### 3.5.3 Análise de Imagens

Todos os biótipos apresentaram reduções do número de pixels, com o aumento das doses dos herbicidas (Figuras 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 e 3.15). Este resultado era esperado, considerando que os pixels correspondem à área vegetal verde.

Para o biótipo suscetível (S), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha com a dose recomendada dos inibidores da PROTOX (1x), nos três períodos de avaliação (7, 14 e 21 DAA), foram 87% (carfentrazone), 93% (oxadiazon) e 95% (carfentrazone), respectivamente (Figura 3.11, A, B e C).

As reduções de pixels estiveram estreitamente relacionadas com os dados de controle (Figura 3.11, A, B e C). Os herbicidas oxadiazon e carfentrazone, que obtiveram as maiores reduções de pixels em relação à testemunha, também estiveram entre os que resultaram em maiores níveis de controle.



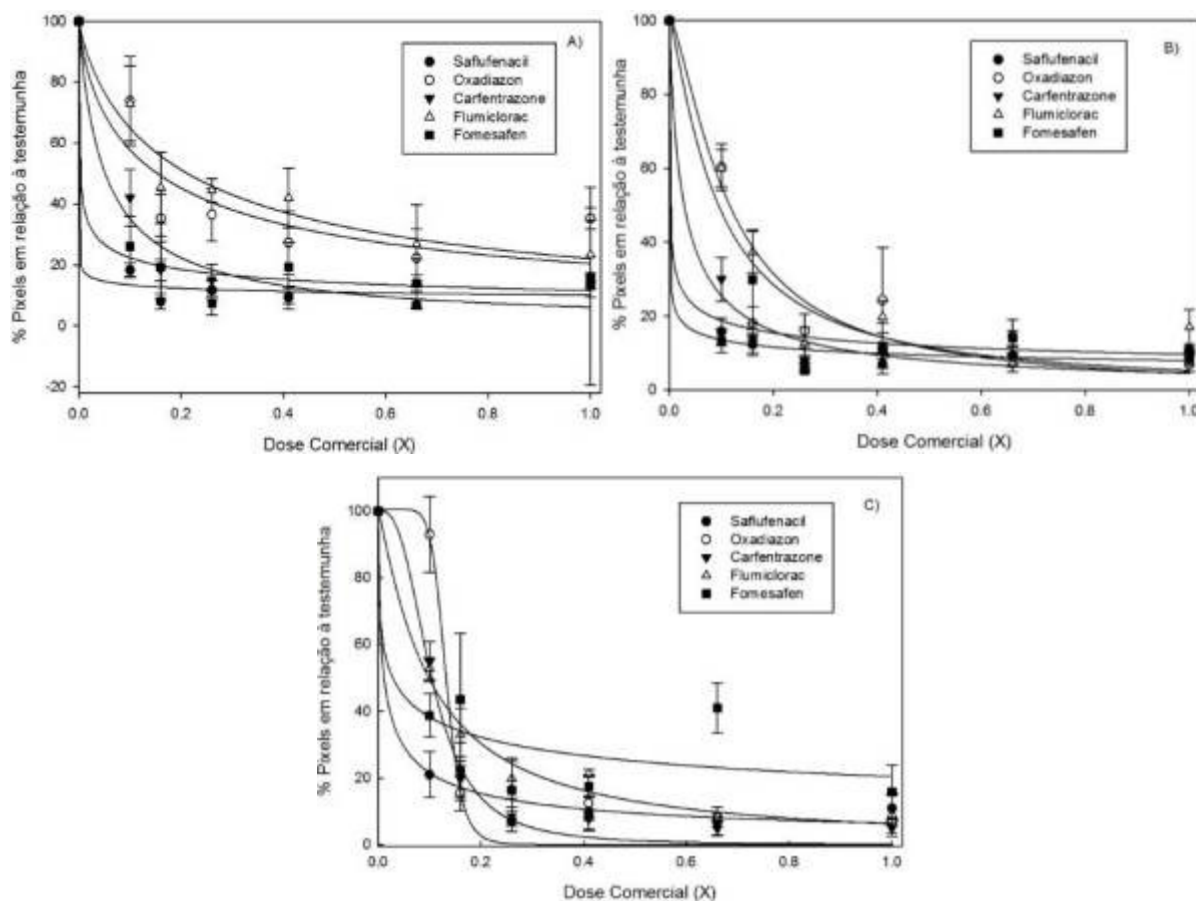


Figura 3.11 - % de pixels em relação à testemunha do biótipo Suscetível de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.12. UTFPR, Pato Branco –PR, 2014.

Aos 7 DAA, os C<sub>50</sub> variaram de <0,0001 (saflufenacil) até 154 (oxadiazon) (Tabela 3.12). Os C<sub>80</sub> neste período para o oxadiazon e flumiclorac, foram superiores às doses máximas testadas (1x). Aos 14 DAA os C<sub>50</sub> variaram de <0,0001 (saflufenacil) até 94 (oxadiazon) e os C<sub>80</sub> de 0,5 (saflufenacil) até 290 (oxadiazon). Aos 21 DAA, os C<sub>50</sub> variaram de 0,4 (saflufenacil) até 132,3 (oxadiazon). Os C<sub>80</sub> neste período para o fomesafen foi superior à dose máxima recomendada.

Tabela 3.12 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Suscetível aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>		
7	Saflufenacil	100	0,14	<0,0001	0,99	<0,0001	0,1
	Oxadiazon	101	0,72	149	0,92	154	>1000
	Carfentrazone	100	0,92	1,5	0,98	1,5	6,9
	Flumiclorac	100	0,81	12,6	0,98	12,6	>60
	Fomesafen	100	0,34	0,7	0,99	0,7	37,5
14	Saflufenacil	100	0,26	<0,0001	0,99	<0,0001	0,5
	Oxadiazon	101	1,22	93,1	0,96	94	290
	Carfentrazone	100	0,85	0,8	0,99	0,8	4,2
	Flumiclorac	101	1,41	6,9	0,97	7	18,6
	Fomesafen	100	0,34	0,3	0,98	0,3	20
21	Saflufenacil	100	0,60	0,4	0,99	0,4	4,2
	Oxadiazon	101	8,66	132,3	0,97	132,3	155
	Carfentrazone	100	2,77	3,1	0,99	3,1	5,2
	Flumiclorac	100	1,17	5,9	0,99	5,9	19,2
	Fomesafen	100	0,38	7,2	0,93	7,2	>250

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose para obter uma redução de 50% dos pixels. C<sub>80</sub>= Dose necessária para obter uma redução de 80% dos pixels. \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Medianeira, com a dose comercial (1x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.12 A, B e C) foram de 84% (saflufenacil), 90,2% (oxadiazon) e 86% (saflufenacil), respectivamente. Com a maior dose testada (16,4x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA, foram 89,7% (oxadiazon), 93,7% (oxadiazon) e 93% (oxadiazon e flumiclorac), respectivamente.

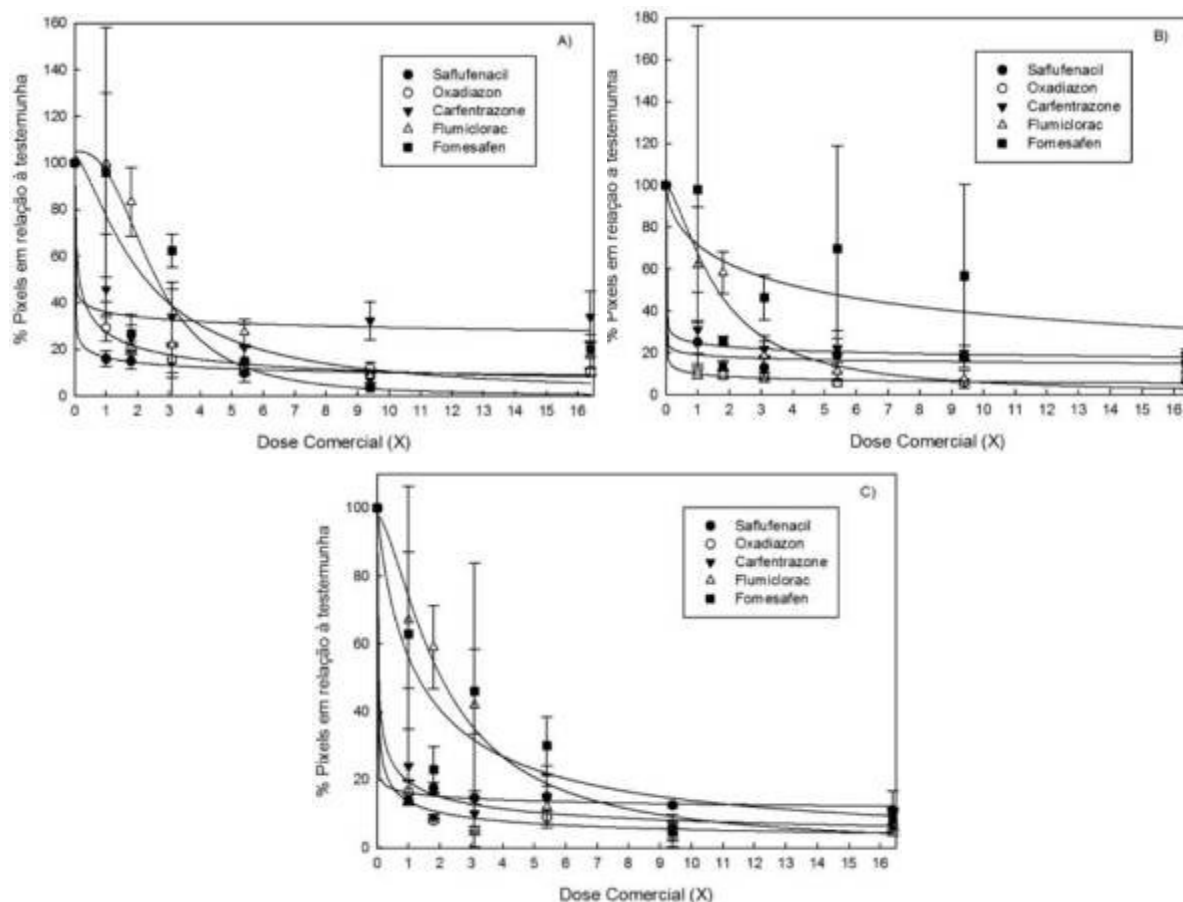


Figura 3.12 - % de pixels em relação à testemunha do biótipo Medianeira de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.13. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os valores de  $C_{50}$  e  $C_{80}$  do biótipo Medianeira são descritos na Tabela 3.13. Aos 7 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 0,1 (saflufenacil) até 562,5 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 14 (saflufenacil) até acima da dose máxima utilizada (carfentrazone). Aos 14 DAA, os  $C_{50}$  variaram de <0,0001 (saflufenacil e carfentrazone) até 1150 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 21 (saflufenacil) até acima da dose máxima utilizada (fomesafen). Aos 21 DAA os  $C_{50}$  variaram de <0,0001 (saflufenacil) até 327,8 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 3,9 (saflufenacil) até 1537,5 (fomesafen)

Os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, apresentados pelo biótipo Medianeira foram 9186,7 (saflufenacil), 3538,5 (fomesafen) e 45,8 (fomesafen), respectivamente (Tabela 3.13), enquanto que os menores FR's para os mesmos períodos foram, 0,2 (carfentrazone), 0,001 (carfentrazone) e <0,0001 (saflufenacil).

Tabela 3.13 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Medianeira aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,2	0,1	0,99	0,1	14	9186,7
	Oxadiazon	100	0,51	149,2	0,99	149,2	2250	0,9
	Carfentrazone	100	0,131	0,4	0,96	0,4	>492	0,2
	Flumiclorac	105	2,64	151,6	0,95	157,2	262,2	12,5
	Fomesafen	103	1,42	541,6	0,87	562,5	1475	865,4
14	Saflufenacil	100	0,11	<0,0001	0,99	<0,0001	21	0,015
	Oxadiazon	100	0,23	0,1	0,99	0,1	25	0,001
	Carfentrazone	100	0,14	<0,0001	0,99	<0,0001	213	0,014
	Flumiclorac	99	1,53	98,4	0,98	97,8	243	14
	Fomesafen	101	0,60	1124,3	0,70	1150	>4103	3538,5
21	Saflufenacil	100	0,12	<0,0001	0,99	<0,0001	3,9	<0,0001
	Oxadiazon	100	0,45	16,5	0,99	16,5	360	0,13
	Carfentrazone	100	0,45	1,3	0,99	1,3	27	0,4
	Flumiclorac	98	1,52	126,1	0,99	123	309	20,9
	Fomesafen	100	0,90	327,8	0,94	327,8	1537,5	45,8

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose para obter uma redução de 50% dos pixels. C<sub>80</sub>= Dose necessária para obter uma redução de 80% dos pixels. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Vilhena, com a dose comercial (1x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.13 A, B e C) foram de 90% (saflufenacil), 95,5% (fomesafen) e 78,2% (fomesafen), respectivamente. Com a maior dose testada (16,4x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA, foram 97% (fomesafen), 98,2% (fomesafen) e 99,4% (carfentrazone), respectivamente.

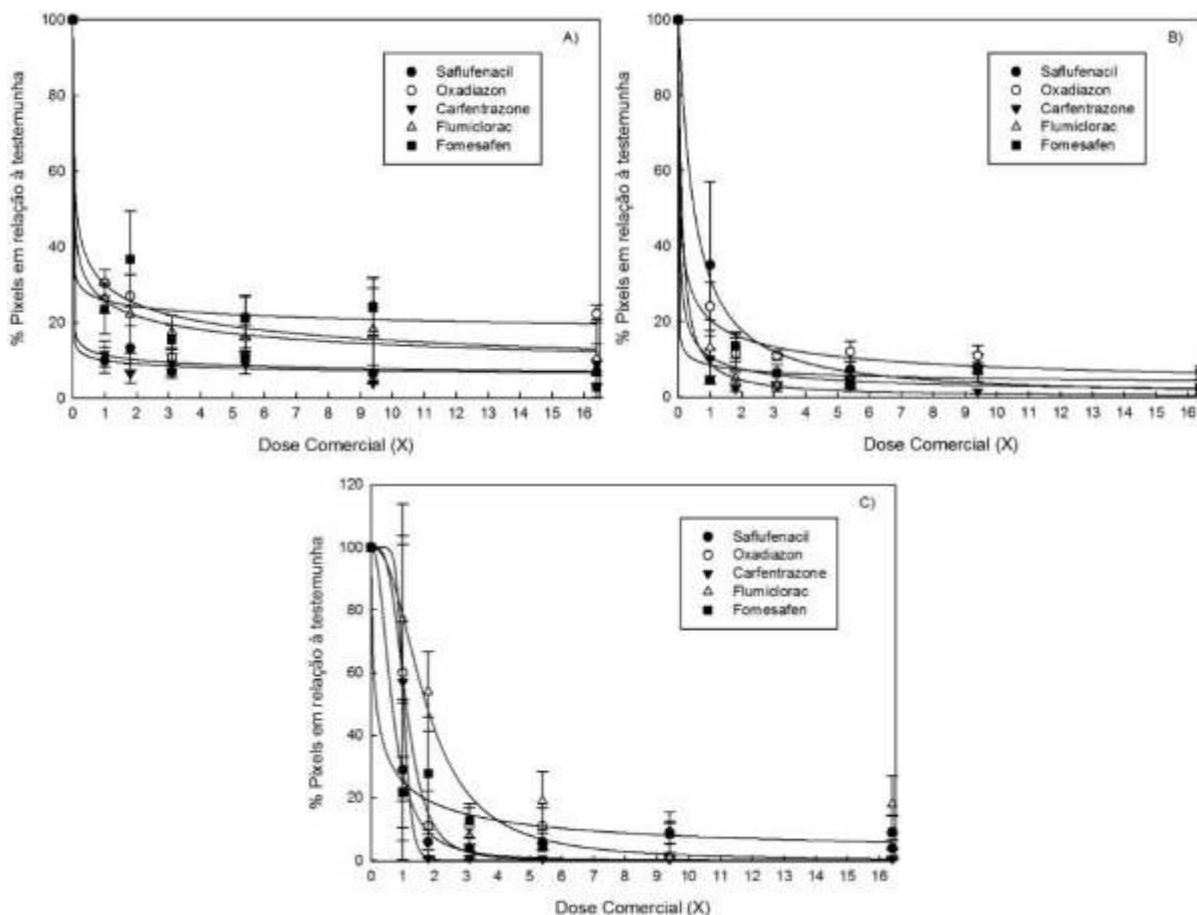


Figura 3.13 - % de pixels em relação à testemunha do biótipo Vilhena de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.14. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  são descritos na Tabela 3.14. Aos 7 DAA, os  $C_{50}$  variaram de  $<0,001$  (carfentrazone) até 27,3 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 0,2 (carfentrazone) até 11500 (oxadiazon). Aos 14 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 0,02 (fomesafen) até 58,1 (oxadiazon). Os  $C_{80}$  variaram de 5 (fomesafen) até 1060 (oxadiazon). Aos 21 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 23,3 (saflufenacil) até 1106 (oxadiazon). Os  $C_{80}$  variaram de 36,5 (carfentrazone) até 1640 (oxadiazon)

Os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, apresentados pelo biótipo Vilhena foram 103,4 (saflufenacil), 6436,5 (saflufenacil) e 56,8 (saflufenacil), respectivamente (Tabela 3.14), enquanto os menores FR's para os mesmos períodos foram,  $<0,0001$  (carfentrazone), 0,07 (fomesafen) e 5,9 (fomesafen).

Tabela 3.14 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Vilhena aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,2	0,001	0,99	0,001	1,1	103,4
	Oxadiazon	100	0,13	0,2	0,98	0,2	11500	0,001
	Carfentrazone	100	0,16	<0,001	0,99	<0,001	0,2	<0,0001
	Flumiclorac	100	0,32	2,3	0,99	2,3	168	0,2
	Fomesafen	100	0,38	27,3	0,97	27,3	1062,5	42
14	Saflufenacil	100	1,10	17,3	0,99	17,3	60,9	6436,5
	Oxadiazon	100	0,48	58,1	0,99	58,1	1060	0,6
	Carfentrazone	100	1,07	3,4	0,99	3,4	12,5	3,9
	Flumiclorac	100	0,59	1,6	0,99	1,6	16,8	0,2
	Fomesafen	100	0,25	0,02	0,99	0,02	5	0,07
21	Saflufenacil	100	2,30	23,3	0,99	23,3	42,7	56,8
	Oxadiazon	100	3,53	1104,2	0,98	1106	1640	8,4
	Carfentrazone	100	8,59	31	0,99	31	36,5	9,9
	Flumiclorac	100	2,31	104,3	0,96	104,3	190,2	17,7
	Fomesafen	100	0,60	41,9	0,99	41,9	412,5	5,9

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose para obter uma redução de 50% dos pixels. C<sub>80</sub>= Dose necessária para obter uma redução de 80% dos pixels. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Bom Sucesso do Sul, com a dose comercial (1x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.14 A, B e C) foram de 68% (flumiclorac), 87,2% (oxadiazon) e 82,9% (oxadiazon), respectivamente. Com a maior dose testada (16,4x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA, foram 85,2% (flumiclorac), 95,5% (flumiclorac) e 98,5% (flumiclorac), respectivamente.

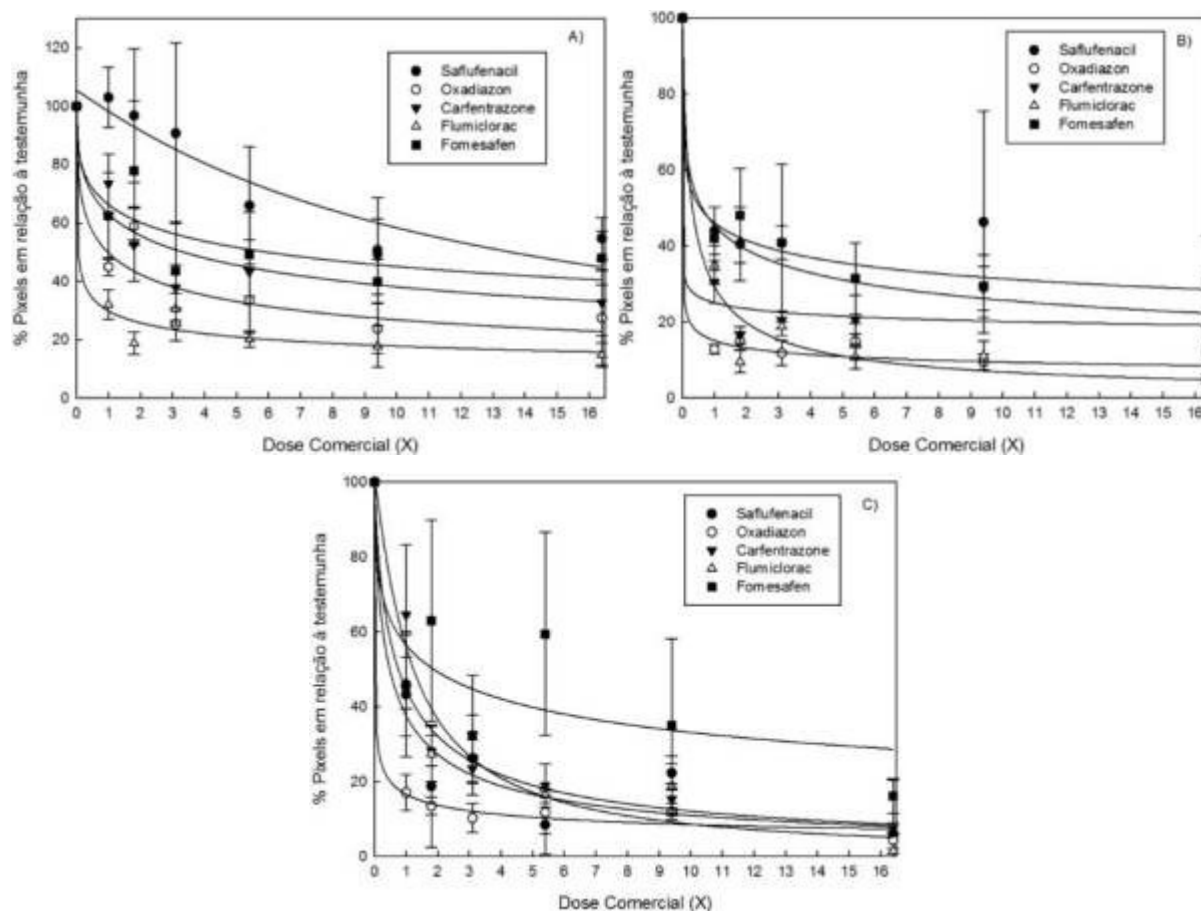


Figura 3.14 - % de pixels em relação à testemunha do biótipo Bom Sucesso do Sul de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.15. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os  $C_{50}$  e  $C_{80}$  do biótipo Bom Sucesso do Sul, descritos na Tabela 3.15, foram inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 3.5). Aos 7 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 3,3 (flumiclorac) até 1487,5 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 372 (flumiclorac) até doses superiores as máximas utilizadas (saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone e fomesafen). Aos 14 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 0,003 (carfentrazone) até 140,4 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 117 (flumiclorac) até doses superiores as máximas utilizadas (saflufenacil e fomesafen). Aos 21 DAA os  $C_{50}$  variaram de 7,5 (oxadiazon) até 467,5 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 126 (saflufenacil e carfentrazone) até dose superior a máxima utilizada (fomesafen).

Os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, apresentados pelo biótipo Bom Sucesso do Sul foram >10000 (saflufenacil), 8042,4 (saflufenacil) e 65,4 (fomesafen), respectivamente (Tabela 3.15), enquanto os menores FR's para os mesmos períodos foram, 0,26 (flumiclorac), 0,004 (carfentrazone) e 0,06 (oxadiazon).

Tabela 3.15 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Bom Sucesso do Sul aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	105	1	430,4	0,94	476	>574	>10000
	Oxadiazon	100	0,43	982,2	0,95	982,2	>16413	6,4
	Carfentrazone	101	0,4	98,1	0,94	100,8	>492	65,6
	Flumiclorac	100	0,29	3,3	0,99	3,3	372	0,26
	Fomesafen	100	0,38	1473,2	0,90	1487,5	>4103	2288,5
14	Saflufenacil	100	0,38	21,6	0,92	21,6	>574	8042,4
	Oxadiazon	100	0,23	0,6	0,99	0,6	240	0,006
	Carfentrazone	100	0,12	0,003	0,98	0,003	255	0,004
	Flumiclorac	100	0,75	18,7	0,99	18,7	117	2,7
	Fomesafen	100	0,27	140,4	0,99	140,4	>4103	432,1
21	Saflufenacil	100	0,69	16,8	0,97	16,8	126	41
	Oxadiazon	100	0,33	7,5	0,99	7,5	510	0,06
	Carfentrazone	101	1,12	36,4	0,98	36,9	126	11,8
	Flumiclorac	100	0,77	45,4	0,99	45,4	276	7,7
	Fomesafen	99	0,42	477,6	0,88	467,5	>4103	65,4

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose para obter uma redução de 50% dos pixels. C<sub>80</sub>= Dose necessária para obter uma redução de 80% dos pixels. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para o biótipo Vitorino, com a dose comercial (1x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA (Figura 3.15 A, B e C) foram de 82% (oxadiazon), 94% (oxadiazon) e 86% (oxadiazon), respectivamente. Com a maior dose testada (16,4x), as maiores reduções de pixels em relação à testemunha aos 7, 14 e 21 DAA, foram 93% (flumiclorac), 98% (saflufenacil) e 97,2% (oxadiazon), respectivamente.



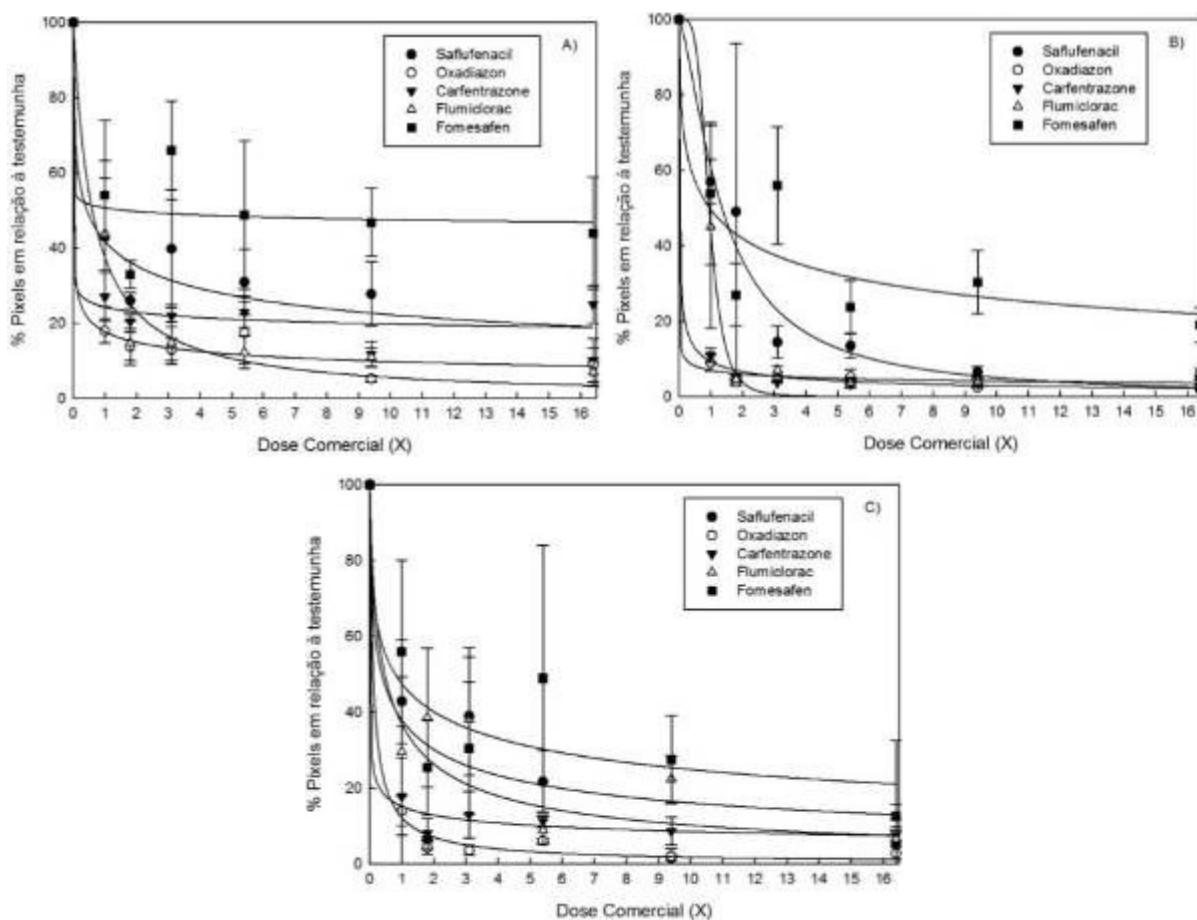


Figura 3.15 - % de pixels em relação a testemunha do biótipo Vitorino de *Euphorbia heterophylla* em resposta a aplicação dos herbicidas aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após aplicação. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. Parâmetros das equações na Tabela 3.16. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Os valores de  $C_{50}$  e  $C_{80}$  do biótipo Vitorino descritos na Tabela 3.16, foram inferiores aos obtidos nas avaliações de controle (Tabela 3.6). Aos 7 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 0,001 (carfentrazone) até 415,6 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 144 (flumiclorac) até superior a dose máxima utilizada (fomesafen). Aos 14 DAA, os  $C_{50}$  variaram de 0,02 (oxadiazon) até 242,6 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 7 (oxadiazon) até superior a dose máxima utilizada (fomesafen). Aos 21 DAA os  $C_{50}$  variaram de 0,1 (carfentrazone) até 199,5 (fomesafen). Os  $C_{80}$  variaram de 9 (carfentrazone) até superior a dose máxima utilizada (fomesafen).

Os maiores FR's aos 7, 14 e 21 DAA, apresentados pelo biótipo Vitorino foram >20000 (saflufenacil), 17684,2 (saflufenacil) e 40,1 (saflufenacil), respectivamente (Tabela 3.16), enquanto os menores FR's para os mesmos períodos foram, 0,001 (carfentrazone), 0,0002 (oxadiazon) e 0,02 (carfentrazone).

Tabela 3.16 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar a dose dos herbicidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>), necessária para obter uma redução de 50% e 80% de pixels (C<sub>50</sub>) e (C<sub>80</sub>) e fatores de resistência (FR) para o biótipo Vitorino aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

DAA	Herbicida	Parâmetros				C <sub>50</sub> **	C <sub>80</sub> **	FR
		A	B	C <sub>50</sub> *	R <sup>2</sup>			
7	Saflufenacil	100	0,4	15,4	0,97	15,4	490	>20000
	Oxadiazon	100	0,30	5,9	0,99	5,9	600	0,04
	Carfentrazone	100	0,12	0,001	0,99	0,001	270	0,001
	Flumiclorac	100	1,01	36	0,99	36	144	2,9
	Fomesafen	100	0,05	415,6	0,89	415,6	>4103	639,3
14	Saflufenacil	100	1,47	47,8	0,99	47,6	122,5	17684,2
	Oxadiazon	100	0,24	0,02	0,99	0,02	7	0,0002
	Carfentrazone	100	0,53	0,4	0,99	0,4	5,7	0,5
	Flumiclorac	100	4,36	57,2	0,99	57,2	78,6	8,2
	Fomesafen	100	0,45	242,6	0,92	242,6	>4103	746,4
21	Saflufenacil	100	0,71	16,4	0,93	16,4	115,5	40,1
	Oxadiazon	100	0,88	106,9	0,99	106,9	515	0,8
	Carfentrazone	100	0,28	0,1	0,99	0,1	9	0,02
	Flumiclorac	100	0,50	22,8	0,96	22,8	354	3,9
	Fomesafen	100	0,44	199,5	0,92	199,5	>4103	27,9

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva, C<sub>50</sub>= Dose para obter uma redução de 50% dos pixels. C<sub>80</sub>= Dose necessária para obter uma redução de 80% dos pixels. FR = C<sub>50</sub> resistente/ C<sub>50</sub> suscetível \*Valores ajustados através do programa SigmaPlot. \*\*Valores estimados através do programa Microsoft Excel.

Para os biótipos Suscetível, Medianeira, Vilhena, Bom Sucesso do Sul e Vitorino, houve correlação negativa significativa ( $p < 0,05$ ) entre níveis de controle e número de pixels, variando entre -0,55 até -0,89 aos 7 DAA, de -0,65 até -0,81 aos 14 DAA e de -0,70 até -0,81 aos 21 DAA (Tabela 3.17). Ou seja, com o aumento dos níveis de controle ocorre uma diminuição da cobertura foliar de EPHHL, detectada através da conversão da imagem digitalizada em pixels.

Tabela 3.17 - Correlação dos níveis de controle e de pixels, para os biótipos Suscetível, Medianeira, Vilhena, Bom Sucesso do Sul e Vitorino, aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Biótipos	DAA	Correlação
Suscetível	7	-0,60*
	14	-0,80*
	21	-0,70*
Medianeira	7	-0,71*
	14	-0,65*
	21	-0,74*
Vilhena	7	-0,89*
	14	-0,74*
	21	-0,74*
Bom Sucesso do Sul	7	-0,55*
	14	-0,81*
	21	-0,76*
Vitorino	7	-0,84*
	14	-0,73*
	21	-0,81*

\*Significativo,  $p < 0,05$ .

A avaliação de imagens digitais é um método promissor, desenvolvida para obtenções de avaliações dinâmicas e precisas (FERREIRA et al., 2001). As suas principais vantagens são, a rapidez que os resultados são obtidos (FERREIRA et al., 2001), a alta precisão dos dados, pode ser usada para avaliar a resposta a alguns herbicidas e medir sintomas, sendo um método não destrutivo, apresenta alta objetividade e reduzida subjetividade dos resultados (ALI et al., 2013), com baixo custo, e sem dependência de um método de calibração (ADAMI et al., 2008).

Os FR's obtidos pela análise de imagens para todos os biótipos foram inferiores aos obtidos com a variável controle visual. Para a análise de imagens o biótipo Medianeira apresenta resistência aos grupos químicos pirimidinedione, ftalamidas e difeniléteres (Tabela 3.13). O biótipo Vilhena, segundo este método de avaliação, apresenta resistência a todos os grupos químicos testados (Tabela 3.14). O biótipo Bom Sucesso do Sul, apresenta resistência a todos os grupos químicos testados (Tabela 3.15), e o biótipo Vitorino aos grupos químicos pirimidinedione, ftalamidas e difeniléteres (Tabela 3.16). Com a avaliação de controle visual, os quatro biótipos R apresentam resistência a todos os cinco grupos químicos testados.

Esse trabalho demonstra que para a determinação da resposta de EPHHL aos inibidores da PROTOX é possível utilizar variáveis como o controle visual, reduções de MPAV e MPAS e também a análise de imagens através da

conversão em pixels. O número de pixels está correlacionado significativamente com o controle obtido (Tabela 3.17).

A adoção da avaliação por imagens digitais é um método bastante interessante, para avaliação de efeito herbicida, demonstrando dados bastante representativos da condição real do efeito herbicida sobre plantas daninhas (ALI et al., 2013), sendo esta técnica já utilizada identificar e quantificar a lesão por herbicida (HENRY et al., 2004; HUANG et al., 2010; ALI et al., 2013) e para avaliação de plantas de cobertura do solo (RASMUSSEN et al., 2007).

Com os biótipos de EPHHL estudados pode-se confirmar a presença de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX em todos os biótipos testados, e estes biótipos apresentam resistência cruzada aos grupos químicos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione. Classificando estes biótipos segundo o seu nível de R aos inibidores da PROTOX, tem-se a seguinte classificação: Bom Sucesso do Sul > Vitorino > Medianeira > Vilhena.

Tanto a tolerância quanto a resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX, em diversas espécies, pode ocorrer através de vários mecanismos, como a mínima translocação, associada à rápida metabolização (EASTIN, 1971), absorção reduzida (SILVA et al., 2007), alta concentração da enzima glutathione-s-transferase (FREAR; SWANSON, 1973), rápida metabolização (DAYAN et al. 1996; DAYAN et al., 1997, THOMAS et al., 2005), aumento da concentração da enzima PROTOX nas mitocôndrias (WARABI et al., 2001), mutação em gene nuclear (PATZOLDT et al. 2006), super expressão de genes responsáveis pela geração da enzima PROTOX, (II JUNG; KUK, 2007), alteração do local alvo (DAYAN; DUKE, 1997).

Recentemente, foi comprovado que a resistência da PROTOX em biótipo de *Amaranthus tuberculatus* ocorreu devido a modificação no DNA, como a deleção da Gly210 que codifica a PROTOX (PATZOLDT et al. 2006; HAO et al., 2009; DAYAN et al., 2010). A mutação de substituição de um códon de arginina por um códon de leucina numa área conservada (R98L) do gene PPX2 é o segundo mecanismo identificado para a evolução da resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX (ROUSONELOS et al., 2012).

A resistência pela alteração no local ação em geral é atribuída a biótipos com valores de FR superiores a 10, comparada com a resistência pela não alteração do local de ação (DAYAN; DUKE, 1997). No presente experimento, não foi possível inferir se a resistência é devida ou não ao local de ação alterado, porque os

valores de FR variaram de acordo com o herbicida utilizado, sendo por vezes inferiores a 10 e algumas vezes superiores a este valor. Assim, observa-se que as causas da resistência aos inibidores da PROTOX ainda não foram totalmente elucidadas, e novas pesquisas necessitam ser realizadas.

A confirmação de resistência múltipla e da resistência cruzada aos inibidores da ALS e da PROTOX, nos biótipos Medianeira, Vilhena, Bom Sucesso do Sul e Vitorino, chama atenção, pois estes casos trazem preocupações, pela dificuldade de manejo destas plantas, necessitando de novas estratégias de manejo, além de mudanças no manejo de plantas daninhas nestas áreas de lavoura.

O estudo do surgimento de casos de plantas daninhas com resistência múltipla e resistência cruzada apresenta grande importância, visto que o manejo destas fica dificultado por limitado número de herbicidas alternativos para serem usados no controle dos biótipos R. A ocorrência de resistência múltipla agrava ainda mais o problema, já que, neste caso, são dois ou mais os mecanismos que precisam ser substituídos. E a resistência cruzada a vários grupos químicos dentro de um mecanismo de ação impede a utilização de várias alternativas simultaneamente. Assim, o controle dos biótipos R com o uso de herbicidas fica comprometido, o que restringe esta prática a outros métodos de controle menos eficientes.

É importante destacar que todos os biótipos R testados neste trabalho eram provenientes de áreas de lavoura com uso intensivo de inibidores da PROTOX e, portanto, foram selecionados pela aplicação de herbicidas desse mecanismo de ação. Em todos os casos, o fomesafen foi o principal agente selecionador da resistência, pelo seu uso frequente nas propriedades. Embora o saflufenacil nunca tenha sido utilizado em nenhuma das propriedades, visto que ele foi lançado recentemente no Brasil, os biótipos apresentaram resistência cruzada aos cinco grupos químicos testados em muitos casos apresentando FR bastante elevados. Isso comprova o fato da existência de resistência em biótipos para herbicidas que ainda não foram ainda lançados.

Os biótipos estudados neste trabalho chamam a atenção por apresentaram resistência aos inibidores da ALS (Capítulo 01) e da PROTOX, com resistência cruzada aos grupos químicos registrados e utilizados nas áreas agrícolas do Brasil. Estes biótipos são de áreas agrícolas distintas, e distantes espacialmente umas das outras, o que sugere eventos independentes. Os inibidores da PROTOX foram utilizados nestas áreas por serem mecanismos de ação alternativos a casos

de resistência já existentes. O tempo de sua utilização nas áreas não foram muito longo. O biótipo Vilhena, de município do mesmo nome, provem de áreas de lavoura de uma região de fronteira agrícola em que apenas recentemente se iniciou a utilização de herbicidas. O surgimento de resistência em período pequeno de anos traz grandes preocupações, pois aplicações repetitivas de herbicidas, com o mesmo mecanismo de ação, em uma população de plantas provocam seleção direcional e progressiva de indivíduos que possuem genes de resistência. As plantas que expressam o gene de resistência são selecionadas, tornando-se predominantes rapidamente na área (KISSMANN, 1996; VARGAS; ROMAN, 2006), como é os biótipos estudados neste trabalho. Assim, os estudos que determinaram a confirmação da resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX em biótipos de EPHHL nos estados do Paraná e Rondônia são de grande importância sob os aspectos de adoção de medidas preventivas e pelo conhecimento da existência de resistência cruzada e dos fatores de resistência.

### 3.6 CONCLUSÕES

Os quatro biótipos de *Euphorbia heterophylla* com suspeita de resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX apresentam a resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX. Segundo o seu nível de resistência, a seguinte ordem pode ser estabelecida: Bom Sucesso do Sul > Vitorino > Medianeira > Vilhena.

A resistência cruzada aos grupos químicos dos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione foi confirmada para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira. Estes apresentaram resistência a herbicidas que nunca foram aplicados anteriormente nestes biótipos.

Os métodos de cálculo do  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  através dos softwares SigmaPlot 10.0 e Excel apresentam elevada correlação positiva e significativa, indicando que ambos os métodos podem ser empregados para o cálculo desses parâmetros.

O método de controle por avaliação de pixels, através de imagens digitais pode ser um método adotado para avaliação de controle dos inibidores da PROTOX, pois há correlação negativa significativa entre este método e de avaliação de controle visual.

#### 4. CAPÍTULO III- ATIVIDADE DA ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE EM *Euphorbia heterophylla* L. COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX

##### 4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade da enzima ALS em biótipos de leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) com resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX na presença e ausência dos herbicidas imazapyr, imazethapyr e nicosulfuron. Efetuou-se ensaio *in vitro* da enzima acetolactato sintase (ALS) extraída de plantas dos biótipos Vitorino, Bom Sucesso do Sul e Medianeira (com resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX) e de um biótipo suscetível, na ausência e presença dos herbicidas testados. Na ausência dos herbicidas, os biótipos com resistência múltipla demonstraram maior afinidade da enzima pelo substrato piruvato em comparação ao biótipo suscetível. Os herbicidas imazapyr, imazethapyr e nicosulfuron produziram reduzido efeito sobre a atividade da enzima ALS dos biótipos resistentes e, ao contrário, elevado efeito inibitório sobre a ALS do biótipo suscetível. Os fatores de resistência foram elevados, superiores a 438, 963 e 474 para os biótipos Vitorino, Bom sucesso do Sul e Medianeira, respectivamente. A resistência observada deve-se a insensibilidade da enzima ALS tanto aos herbicidas do grupo das imidazolinonas quanto das sulfoniluréias, caracterizando resistência cruzada.

##### 4.2 ABSTRACT

The objective of this study was to determine the activity of the enzyme acetolactate synthase on wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) biotypes with multiple resistance to ALS and PROTOX inhibitors, either in the presence and or on the absence of the herbicides imazapyr, imazethapyr and nicosulfuron. *In vitro* enzyme activity assay were conducted on ALS extracted from plants from Vitorino, Bom Sucesso do Sul and Medianeira biotypes (with multiple resistance) and a susceptible population, both in the absence and presence of the herbicides. In the absence of herbicides, the biotypes with multiple resistance showed higher affinity for the substrate of the enzyme compared to the susceptible population. The herbicides



imazapyr, imazethapyr and nicosulfuron did not affect the enzyme activity of ALS-resistant biotypes and, conversely, they had high inhibitory effect on the ALS-susceptible population. The resistance factors were very high, superior than 438, 963, and 474 for Vitorino, Bom Sucesso do Sul, and Medianeira biotypes, respectively. These results strongly suggest the resistance to ALS inhibitors on the EPHHL biotypes tested is due to an ALS insensitivity to the herbicides of both imidazolinone and sulfonilurea groups, featuring cross-resistance.

#### 4.3 INTRODUÇÃO

Os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) ganharam popularidade na comunidade agrícola e tiveram seu uso aumentado gradativamente devido à elevada eficácia agrônômica no controle de diversas espécies, às baixas doses recomendadas, à baixa toxicidade aos mamíferos e à seletividade a várias culturas (MONQUERO et al., 2000; TREZZI; VIDAL, 2001). Atualmente, representam o mecanismo com o maior número de herbicidas em uso no mercado (DEVINE; SHUKLA, 2000).

A enzima ALS (EC 2.2.1.6), também conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS), atua na rota da síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (DEVINE; SHUKLA, 2000). Para sua atividade catalítica, a enzima ALS requer os cofatores tiamina pirofosfato (TPP), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e um íon metálico bivalente  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (KIM et al., 2003). Ela representa o alvo de ação de muitos herbicidas, como os pertencentes aos grupos químicos das imidazolinonas, pirimidilbenzoatos, sulfonilidas e sulfoniluréias (ROMAN et al., 2007). Estes herbicidas ligam-se fortemente à enzima, impedindo o acesso ao seu sítio ativo (PANG et al., 2003), resultando em uma inibição não-competitiva (DEVINE et al., 1993).

O emprego quase que exclusivo de controle de plantas daninhas com herbicidas, acarretou aumento no número de casos de resistência, sendo, atualmente, registrados no mundo 221 espécies, dentre estas 129 dicotiledôneas e 92 monocotiledôneas (HEAP, 2014). Cerca de 34% de todos os casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas registrados referem-se à resistência aos inibidores da ALS, constituindo-se o mecanismo com maior número de casos registrados.

O leiteiro ou amendoim bravo (*E. heterophylla*) ou (EPHHL) é uma planta daninha que causa grande preocupação pela sua alta capacidade e habilidade competitiva com as culturas de lavoura (CHEMALE; FLECK, 1982). No mundo, atualmente, estão registrados quatro casos de resistência de EPHHL aos herbicidas, três deles com resistência aos inibidores da ALS, sendo que em um deles ocorre simultaneamente a resistência aos inibidores da PROTOX (HEAP, 2014; TREZZI et al., 2005). Nos biótipos de EPHHL com resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX, detectados na região Sudoeste do Paraná, provavelmente a resistência tenha ocorrido em um sistema de cascata (TREZZI et al., 2005). Ou seja, primeiramente houve grande pressão de seleção causada por inibidores da ALS e, posteriormente, por inibidores da PROTOX o que resultou na seleção da resistência aos dois mecanismos de ação, em momentos distintos, na mesma população. No entanto, estes biótipos ainda não tiveram seu mecanismo de resistência totalmente elucidado.

A medição da atividade da enzima ALS de biótipos resistente e suscetível, em resposta a doses crescentes dos herbicidas imazapyr e imazethapyr, evidenciam que a resistência apresentada por EPHHL aos herbicidas inibidores da ALS é, provavelmente, devida exclusivamente à insensibilidade da enzima ALS a esses herbicidas (VARGAS, 2000). Estudos de resistência *in vitro* com ALS por diversos autores (WRIGHT; PENNER, 1998; VARGAS et al., 1999) têm sido realizados com a extração e purificação da enzima. A utilização de metodologia de extração e purificação da ALS é menos trabalhosa e mais rápida pode facilitar o uso desta técnica como método de diagnóstico de resistência aos herbicidas (OLIVEIRA et al., 2002).

Assim, a identificação de resistência em plantas daninhas é uma grande ferramenta para o melhor manejo, podendo tornar mais eficiente a prevenção e também melhorar o controle de plantas daninhas já resistentes. O diagnóstico da resistência em uma população de plantas daninhas de forma rápida, eficaz e precisa, ajuda a prevenir a disseminação de sementes resistentes na área, evitando problemas futuros (VIDAL et al., 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a atividade da enzima ALS de biótipos com resistência múltipla com biótipo suscetível, na ausência e na presença dos herbicidas inibidores enzimáticos imazapyr, imazethapyr e nicosulfuron.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

No experimento utilizaram-se biótipos de EPHHL suscetível (S) e com suspeita de resistência múltipla (R) aos inibidores da ALS e da PROTOX. Os biótipos utilizados foram denominados de Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Suscetível, sendo suas origens nos municípios de Bom Sucesso do Sul, Vitorino e Medianeira (Paraná) e São Paulo (São Paulo), respectivamente.

A primeira etapa do experimento ocorreu em casa de vegetação, onde foram semeados os biótipos em vasos, para coleta de tecidos foliares. Esta coleta foi realizada quando as plantas de EPHHL atingiram o estágio de três a quatro folhas. Os materiais vegetais foram identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

A segunda etapa constou do ensaio da enzima ALS, em laboratório. Este ensaio foi baseado no método proposto por Gerwick et al. (1993), com modificações. A extração da enzima ocorreu com maceração do material vegetal de EPHHL, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6 (3:1 v/m), contendo, para cada 100 mL de solução, 2,2 g de piruvato de sódio (200 mM), 0,025 g de cloreto de magnésio (1,25 mM), 0,057 g de tiamina pirofosfato (TPP) (1,25 mM) e 0,207 mg de flavina adenina dinucleotídeos (FAD 2,5  $\mu$ M). No processo de maceração foi adicionado polivinilpirrolidona (PVPP) na proporção de 0,25 g para cada grama de material vegetal. O material macerado foi filtrado e centrifugado a 15.500 rpm, por 15 minutos a 4 °C, obtendo-se, assim, o extrato enzimático.

Para o ensaio *in vitro* da ALS, em tubos de ensaio, adicionaram-se 500  $\mu$ L de água destilada (para os controles positivos – 100% da atividade da ALS) ou 500  $\mu$ L de solução herbicida, acrescentando-se 250  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 N aos controles denominados negativos (0% de atividade da enzima ALS). Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de extrato enzimático nos tubos, os quais foram incubados por um período de 90 min a 37 °C. Decorrido este tempo, as reações foram interrompidas com 250  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 N, exceto nos controles negativos. Todos os tratamentos constaram de três repetições.

Em seguida, iniciou-se a segunda incubação por 15 min a 60 °C, para a formação da acetoína, que ocorre pela reação do ácido sulfúrico com o acetolactato, formado durante a primeira reação. Depois, adicionaram-se 700  $\mu$ L de uma solução

de hidróxido de sódio 2 N contendo creatinina a 0,25% e naftol a 2,5%, para a reação de formação do complexo colorido. Após, os tubos foram novamente incubados por 15 min a 60 °C. Posteriormente, foram obtidas as absorvâncias através de leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 535 nm.

Foram preparadas soluções aquosas dos herbicidas imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron para o ensaio da ALS. As concentrações finais dos herbicidas, nos tubos de ensaio, foram de 0 (100% da atividade da enzima), 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 µM para o biótipo S e 0, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 µM para os R. Para os ensaios de atividade enzimática utilizaram-se diferentes concentrações do substrato piruvato (0; 2,5; 5; 10; 15; 20 ; 40; 60; 80; 100; 160 mM para o biótipo S; e 0; 2,5; 5; 10; 15;20; 40; 60 mM para os R), seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Nos ensaios de inibição, os resultados foram calculados em porcentagem, considerando-se como 100% de atividade (sem presença do inibidor). Os valores de atividade da ALS foram expressos em unidade enzimática por miligrama ( $U\ mg^{-1}$  proteína), em que uma unidade da acetolactato sintase é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 0,1 unidade de absorvância por minuto, expresso em função da concentração de proteínas totais (atividade específica). O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976).

Os dados foram submetidos à análise da variância, pelo teste F ( $p < 0,05$ ). As médias entre os tratamentos foram comparadas utilizando-se o teste da diferença mínima significativa (DMS) a 5% de probabilidade. As regressões entre variáveis dependentes e as concentrações de herbicidas foram ajustadas através de modelos não lineares, empregou-se o modelo logístico de três parâmetros. Os valores obtidos foram usados para calcular o  $I_{50}$ , o qual representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima, utilizando o modelo logístico de regressão não linear (SEEFELDT et al., 1995), conforme segue:

$$y = a / (1 + (x / x_{I_{50}})^b),$$

em que:  $y$  = atividade da enzima ALS (%);  $a$  = assíntota de máxima;  $x$  = dose do herbicida (µM);  $x_{I_{50}}$  = dose dos herbicidas (µM) correspondente a 50% da inibição da enzima ALS e  $b$  = declividade da curva.

Os fatores de resistência (FR's) foram calculados por meio do quociente entre os parâmetros  $I_{50}$  dos biótipos R, pelo  $I_{50}$  do biótipo S. Foram utilizados os programas WINSTAT para realização das análises estatísticas e Sigma-

plot 10.0 para a confecção dos gráficos.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da enzima ALS apresentou grande variação entre os biótipos testados (Figura 4.1). A velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) da atividade da enzima ALS observada no biótipo S foi de  $0,26 \text{ U mg}^{-1}$  com a concentração de  $160 \text{ mM}$  de piruvato. Para os biótipos Vitorino, Bom Sucesso do Sul, e Medianeira foram obtidos  $0,45$ ,  $0,49$  e  $0,25 \text{ U mg}^{-1}$ , respectivamente, com a concentração máxima de  $60 \text{ mM}$  de piruvato (Figura 4.1). Os valores de  $K_M$  para os biótipos S, Vitorino, Bom Sucesso do Sul e Medianeira foram, respectivamente, de  $33,7$ ,  $6,96$ ,  $16,9$  e  $4,1 \text{ mM}$  (Figura 4.1). Ou seja, o biótipo S tem menor afinidade pelo substrato do que os biótipos R.

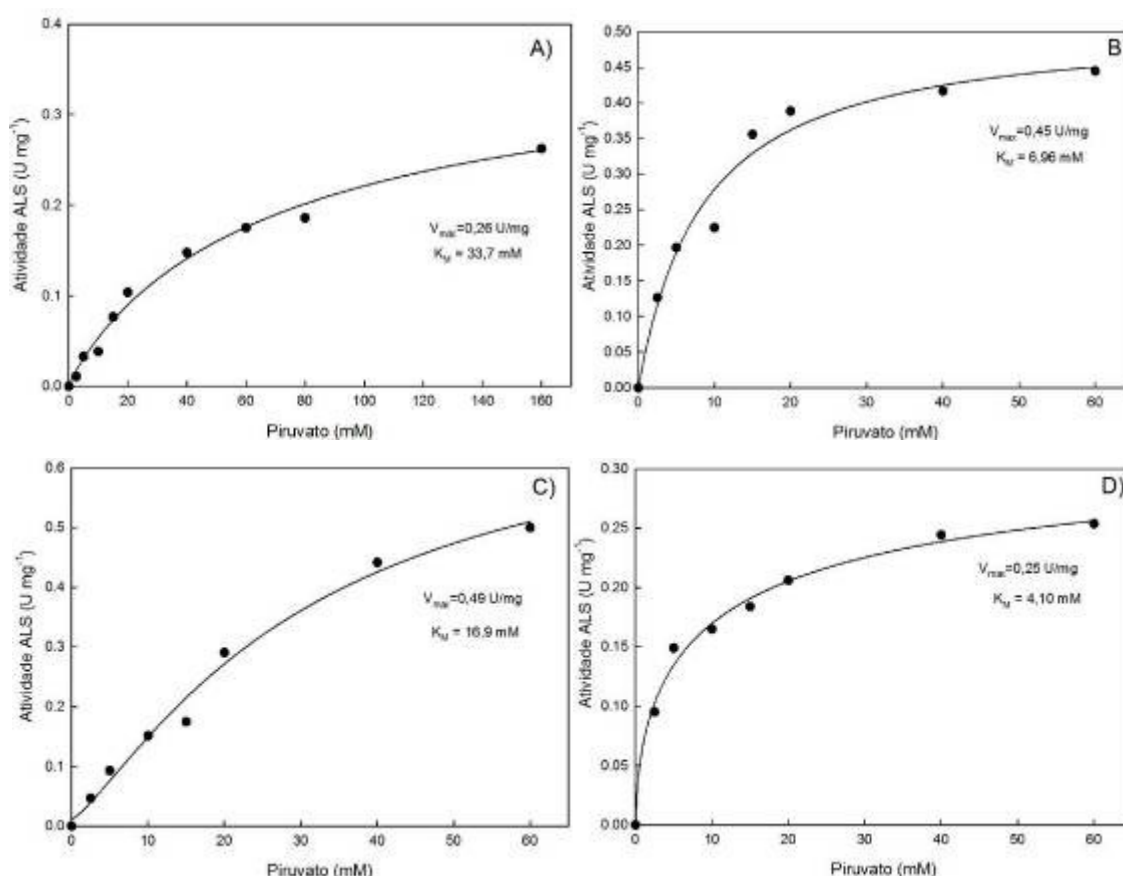


Figura 4.1 - Atividade da enzima acetolactato sintase do biótipo Suscetível (A) e dos biótipos resistentes Vitorino (B), Bom Sucesso do Sul (C) e Medianeira (D) de *E. heterophylla* L., em função das diferentes concentrações de piruvato.  $K_M$  = concentração de piruvato que fornece a metade da velocidade máxima de reação ou a afinidade da enzima pelo substrato, e  $V_{\text{máx}}$  = velocidade máxima da reação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Ao contrário do que foi observado no presente experimento, ao analisar a atividade da enzima ALS de biótipo de EPHHL com resistência apenas a inibidores da ALS, Vargas (2000) obteve valores de  $V_{\text{máx}}$  de  $0,28 \text{ U mL}^{-1}$  para o biótipo S e de  $0,16 \text{ U mL}^{-1}$  para o biótipo R, com a enzima ALS do biótipo R apresentando  $V_{\text{máx}}$  inferior ao observado para a ALS do biótipo S, sugerindo que a mutação ocorrida no gene que codifica a enzima ALS não provocou mudança significativa na afinidade da enzima pelo substrato.

A atividade da enzima ALS do biótipo S foi grandemente inibida por todos os herbicidas testados. Com a maior concentração utilizada ( $8 \mu\text{M}$ ), a redução da atividade da ALS foi de 86%, 80% e 61%, respectivamente, para imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron (Figura 4.2 A).

A utilização da maior concentração dos herbicidas imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron ( $3000 \mu\text{M}$ ) resultou em redução da atividade da enzima ALS do biótipo R Vitorino em 42, 45 e 47%, respectivamente (Figura 4.2 B). Para o biótipo Bom Sucesso do Sul, a mesma concentração resultou em redução da atividade da enzima em 31, 42 e 19% (Figura 4.2 C), para a mesma ordem de herbicidas. A mesma concentração resultou em redução da atividade da enzima ALS do biótipo Medianeira em 28% para imazethapyr, 71% para imazapyr e 42% para o nicosulfuron (Figura 4.2 D).

Considerando os três herbicidas, a inibição média da enzima ALS do biótipo S foi de 75,6%. Ensaio preliminar de resposta a dose com a mesma concentração utilizada no biótipo S ( $8 \mu\text{M}$ ) não resultou em inibição enzimática da ALS dos biótipos R (dados não mostrados). A média de inibição enzimática, considerando todos os biótipos R e herbicidas, empregando concentração de  $3000 \mu\text{M}$ , 375 vezes maior do que a usada para o biótipo S, foi de apenas 41%. Isso significa que a enzima ALS dos biótipos R foi muito menos afetada pela ação dos herbicidas, o que sugere alteração no sítio de ligação do inibidor (sítio alostérico) da proteína, já que a inibição é do tipo não competitivo (VARGAS; ROMAN, 2006), tornando-a menos sensível aos mesmos (Figura 4.2).

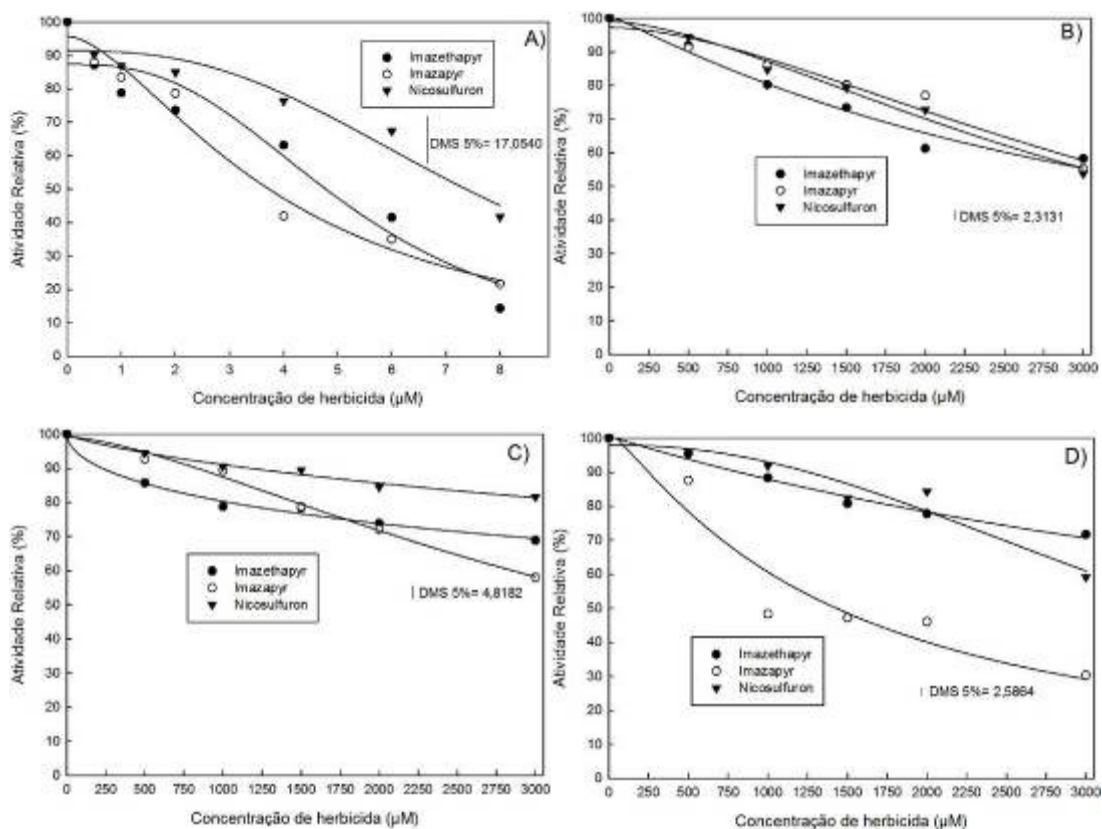


Figura 4.2 - Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de *E. heterophylla* L. do biótipo suscetível (A) e dos biótipos resistentes Vitorino (B), Bom Sucesso do Sul (C) e Medianeira (D), em função das doses crescentes dos herbicidas imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Na literatura, observa-se vários casos no mundo de mutações da enzima ALS que originaram a resistência aos herbicidas inibidores desta, em plantas daninhas. Mutações nas posições Ala 122, Pro-197, Trp-574 e Ser-653 da enzima ALS são encontradas em biótipos de muitas espécies daninhas resistentes, enquanto mutações em outras posições são menos comuns (TRANDEL et al., 2013). Para o grupo das imidazolinonas, têm-se a substituição da Ala 122 (MCNAUGHTON et al., 2005; RIAR et al., 2013), Ala 205 (ASHIGH; TARDIF, 2007); Ser 653 (PATZOLDT; TRANDEL, 2001), Gli 654 (LAPLANTE et al., 2009) e para as sulfoniluréias têm-se a substituição na posição Pro 197 (YU et al., 2008); Asp 376 (ZHENG et al., 2011); Arg 377 (MASSA et al., 2011). A substituição da Trp574 origina alta resistência aos grupos químicos das imidazolinonas e sulfoniluréias simultaneamente (TAN et al., 2007; PATZOLDT; TRANDEL, 2002). A substituição de Ala-122-Tyr resulta em resistência a imidazolinonas, mas não a sulfoniluréias, enquanto que a substituição de Ala-122-Tir resulta em resistência a imidazolinonas, sulfoniluréias e sulfonilidas (HAN et al., 2012).

Os biótipos apresentaram grandes diferenças em relação à concentração necessária para reduzir 50% da atividade de ALS ( $I_{50}$ ) para os herbicidas (Tabela 4.1), que podem ser atribuídas a variações intrínsecas da ALS e a diferenças na estabilidade da enzima (STIDHAM; SINGH, 1991). Os valores de  $I_{50}$  no biótipo S foram muito inferiores (maior  $I_{50} = 7,9 \mu\text{M}$ ) em comparação aos obtidos em Vitorino, Bom Sucesso do Sul e Medianeira (valores de  $I_{50} > 1388 \mu\text{M}$ ).

O maior FR observado para o biótipo Vitorino foi de 953,8, para o herbicida imazapyr. No biótipo Bom Sucesso do Sul foi de 2610,5, para imazethapyr. Já para o biótipo Medianeira foi de 1344,8, para imazapyr. Isto demonstra elevados níveis de resistência nesses biótipos aos herbicidas inibidores da ALS testados. A resistência é do tipo cruzada, pois elevados níveis de resistência foram constatados tanto ao grupo das sulfoniluréias quanto das imidazolinonas.

Tabela 4.1 - Parâmetros da equação logística<sup>1</sup> utilizada para determinar os níveis de imazethapyr, imazapyr e nicosulfuron necessários para reduzir em 50% a atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) dos biótipos resistentes e suscetível de *E. heterophylla* ( $I_{50}$ ), e os fatores de resistência (FR). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Biótipos	Herbicidas	Parâmetros				FR
		A	B	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$	
Vitorino	Imazethapyr	100	1,07	3607,3	0,99	678
	Imazapyr	97	1,7	3748,3	0,98	953,8
	Nicosulfuron	99	1,6	3473,7	0,99	438,6
Bom Sucesso do Sul	Imazethapyr	100	0,6	13888,1	0,99	2610,5
	Imazapyr	99	1,5	3785,7	0,99	963,3
	Nicosulfuron	100	0,8	20359,7	0,99	2570,7
Medianeira	Imazethapyr	100	0,9	7154,5	0,99	1344,8
	Imazapyr	100	1,2	1387,6	0,96	353,1
	Nicosulfuron	98	2,2	3761	0,97	474,9
Suscetível	Imazethapyr	87	2,7	5,3	0,96	-
	Imazapyr	96	1,6	3,9	0,99	-
	Nicosulfuron	91	2,6	7,9	0,96	-

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. A= Assíntota máxima, B= Declividade da curva,  $I_{50}$ = Dose que proporciona redução de 50% na atividade da enzima. FR =  $I_{50}$  resistente/  $I_{50}$  suscetível

Os estudos com a enzima ALS, extraída de plantas de EPHHL R apenas a inibidores da ALS evidenciam valor de  $I_{50}$  superior a 3000  $\mu\text{M}$  para o imazapyr e a 2000  $\mu\text{M}$  para o imazethapyr, contrastando com valores de  $I_{50}$  de 2  $\mu\text{M}$  para o imazapyr e de 0,7  $\mu\text{M}$  para o imazethapyr nas plantas S (VARGAS, 2000), estando, portanto, em concordância com os do presente experimento. Oliveira et al. (2002) obtiveram  $I_{50}$  de 1961,0  $\mu\text{M}$  e de 13,8  $\mu\text{M}$  na avaliação da atividade enzimática da enzima ALS de biótipos de EPHHL R e S, respectivamente, para o



herbicida imazaquin, e FR de 142. Valores muito inferiores de  $I_{50}$  foram obtidos na avaliação da atividade da ALS de *Cyperus difformis* com a aplicação do pyrazosulfuron-ethyl. O  $I_{50}$  para o biótipo R foi de 73  $\mu$ M, enquanto que para o biótipo S foi de 0,57  $\mu$ M (DAL MAGRO et al., 2010). No entanto, todos os trabalhos citados, realizados no Brasil, comprovaram a baixa atividade da enzima ALS de biótipos S, em comparação aos biótipos R, na presença de herbicidas, apontando a insensibilidade da enzima como responsável pela resistência.

Em casa de vegetação, com a pulverização de imazethapyr sobre plantas intactas do biótipo Vitorino (um dos avaliados no presente experimento) se obteve FR de 15 (TREZZI et al., 2005). Com biótipos de EPHHL R a ALS, Gelmini et al. (2001) encontraram FR's para a variável controle de 19 e 26, respectivamente, para chlorimuron-ethyl e imazethapyr. Os FR's do biótipo *Bidens pilosa* R foram de 40,92, 173,84, 57,47 e 57,16 para os herbicidas inibidores da ALS chlorimuron-ethyl, nicosulfuron, metsulfuron-methyl, e imazethapyr, respectivamente (CHRISTOFFOLETI, 2002). Em experimento em casa de vegetação, utilizando biótipos R e S de *B. pilosa*, Christoffoleti et al. (1996) determinaram FR's de 370, 39, 26 e 12 para o biótipo R, comparado com o biótipo S, respectivamente para os herbicidas imazethapyr, nicosulfuron, metsulfuron-methyl e chlorimuron-ethyl.

Os valores de FR em experimentos de laboratório para análise da atividade enzimática são, na maioria das vezes, maiores do que os obtidos em experimentos em casa de vegetação ou a campo, para avaliação dos níveis de controle, isto pelo fato de trabalhar-se com material purificado, em que a enzima é o fator avaliado, sem interferências de outros componentes vegetais. Em experimentos em casa de vegetação, em que os herbicidas são pulverizados sobre plantas intactas, os mesmos têm que ultrapassar várias barreiras até sua chegada aos cloroplastos das plantas e ao sítio de ação enzimático. Isso leva a valores de  $I_{50}$  do biótipo S superiores e, portanto, a valores de FR inferiores.

A ocorrência de casos de resistência a ALS em EPHHL, com elevado fator de resistência, inviabiliza o controle das mesmas, isto porque o uso de herbicidas com este mecanismo de ação não controlará com eficiência a planta daninha alvo. A ocorrência de resistência pela insensibilidade da enzima, como dos biótipos estudados neste trabalho, acaba resultando em elevado fator de resistência, sendo que esta resistência origina por uma alteração na estrutura primária da enzima ALS, resultado de mutações (DEVINE; SHUKLA, 2000).

O uso constante de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação origina o surgimento de biótipos R. O sistema agrícola utilizado atualmente pelos agricultores favorece o aparecimento destas plantas R, no entanto, um manejo conjunto de rotação de mecanismos de ação, com aplicação de herbicidas, seguindo as práticas de manejo integrado, como a rotação de culturas e adoção de novos métodos de controle, pode resultar em controle mais eficiente das plantas daninhas e reduzir, temporariamente, o surgimento de novos casos de plantas daninhas R na área.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Houve aumento da afinidade dos biótipos resistentes pelo substrato piruvato, decorrente da resistência, sugerindo que a alteração na estrutura primária (sequência de aminoácidos) resultou numa enzima mais eficiente, quando comparada ao biótipo S, mesmo na ausência de inibidores.

A resistência dos biótipos de EPHHL com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS é atribuída à menor sensibilidade desta enzima a estes herbicidas.

A perda de sensibilidade da enzima ALS nos biótipos resistentes ocorre tanto em relação ao grupo das imidazolinonas quanto das sulfoniluréias, o que caracteriza resistência cruzada.

## 5. CAPÍTULO IV - ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L. COM RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA PROTOX

### 5.1 RESUMO

As enzimas antioxidantes são importantes no processo de defesa das plantas, quando ocorre o estresse oxidativo. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar as atividades das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase, em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e com resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX, pela aplicação de herbicidas inibidores da PROTOX; determinar se estas enzimas estão relacionadas ao mecanismo de resistência aos inibidores da PROTOX. Para tanto, efetuou-se análise da atividade das enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) extraídas de plantas dos biótipos Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena (com resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX) e de um biótipo suscetível. Os tratamentos consistiram nas aplicações dos herbicidas fomesafen (difeníléter), flumiclorac (ftalamida), carfentrazone (triazolinona), oxadiazon (oxadiazol) e saflufenacil (pirimidinedione) nas proporções de doses comerciais equivalentes a 0x, 0,16x, 0,41 e 1x para o biótipo suscetível e 0x, 1x, 3,1x, 9,4x para os biótipos resistentes. As enzimas POD, SOD e CAT dos biótipos Suscetível, Medianeira, Vitorino, Vilhena e Bom Sucesso do Sul apresentaram aumentos nas atividades enzimáticas pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX. Os resultados indicam que a atividade superior das enzimas antioxidantes SOD e POD nos biótipos Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vitorino, é um provável mecanismo envolvido na resistência aos inibidores da PROTOX.

### 5.2 ABSTRACT

Antioxidant enzymes are important in plant defense process, especially when oxidative stress occurs. The objective of this study were: (1) to characterize the activity of peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) in biotypes of *E. heterophylla* susceptible and with multiple resistance (MR) to ALS-PROTOX inhibitors after the application of PROTOX herbicides; (2) to determine

whether the activities of these enzymes may be a mechanism of resistance to inhibitors PROTOX. The *in vitro* assay evaluated the activity of POD, CAT, and SOD, after these enzymes were extracted from plants of the biotypes from Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira, and Vilhena (with MR to ALS and PROTOX inhibitors) and a susceptible biotype. The treatments consisted of herbicides fomesafen (diphenyl ether) flumiclorac (N-phenyl-phthalimide), carfentrazone (triazolinone), oxadiazon (oxadiazole), and saflufenacil (pyrimidinedione) in the proportions of commercial doses equivalent to 0x, x 0.16, 0.41 and 1x for the susceptible population and 0x, 1x, 3.1x, 9.4 x for the resistant biotypes. The POD, SOD, and CAT enzymes of biotypes Susceptible, Medianeira, Vitorino, Vilhena and Bom Sucesso do Sul showed increase in activity after the PROTOX inhibitors were applied. The results indicate that the higher activity of antioxidant enzymes SOD and POD on plants from the biotypes from Bom Sucesso do Sul, Medianeira and Vitorino, is a likely mechanism involved in resistance to PROTOX inhibitors.

### 5.3 INTRODUÇÃO

A exposição das plantas a fatores bióticos e abióticos do ambiente tais como alterações na temperatura, umidade e radiação, presença de herbicidas e metais pesados, patógenos, insetos, entre outros, gera, muitas vezes, estresses, contra os quais as plantas reagem (RIZZARDI et al., 2003). O estresse oxidativo resulta de uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) que são capazes de causar mudanças estruturais e funcionais em lipídios, como a peroxidação lipídica nas membranas (SCANDALIOS, 1993; THÉRON et al., 2000).

Os herbicidas inibidores da PROTOX são mecanismos indutores de estresse oxidativo. Estes, nas plantas, inibem a enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), a qual atua na rota de síntese da clorofila e de citocromos (HESS, 2000; MEROTTO Jr.; VIDAL, 2001). Deste modo, a protoporfirina IX produzida neste processo, na presença de luz e oxigênio, é oxidada, formando radicais livres como  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , que causam a peroxidação de lipídios e consequente estresse oxidativo (DEVINE et al., 1993; DAYAN; DUKE, 2010). Este estresse desencadeia várias respos-

tas, desde alterações na expressão gênica e metabolismo celular até variações na taxa de crescimento e produção de biomassa (SOARES; MACHADO, 2007).

As plantas possuem sistemas de defesa contra os estresses ambientais que envolvem a formação de EROs, entre os quais destacam-se os antioxidantes lipossolúveis associados às membranas, como  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, os redutores hidrossolúveis, como o tripeptídeo glutathiona (GSH) e o ascorbato, e as enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalases (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2) (FERREIRA, 2007).

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é considerada a primeira linha de defesa contra os danos causados pelas EROs. A enzima atua dismutando o  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  (ALSCHER et al., 2002), fazendo parte do mecanismo central de defesa dos organismos, evitando a formação do radical  $OH^{\cdot}$  (LEÓN et al., 2002). O  $OH^{\cdot}$  e o  $^1O_2$  são tão reativos que suas produções devem ser minimizadas rapidamente. O  $OH^{\cdot}$  tem um grande potencial oxidativo atacando rapidamente e sem discriminação qualquer macromolécula, levando a sérios danos celulares (SCANDALIOS et al., 2000).

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) são enzimas capazes de catalisar a oxidação do  $H_2O_2$  para formação de água (GROPPIA et al., 1999). Elas desempenham um importante papel na biossíntese da parede celular, mas também estão envolvidas nas respostas ao estresse, como a ligação de compostos à parede celular, suberização, explosão oxidativa, entre outras (ALMAGRO et al., 2009). São encontradas em diversas isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em diversos compartimentos celulares (CAMPA, 1991), havendo mais de 70 isoformas relatadas (VEITCH, 2004).

A enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é um componente de defesa antioxidante primário e exerce duas funções importantes: a inativação do  $H_2O_2$  a água e oxigênio ( $H_2O + O_2$ ), formado durante a conversão do glicolato a glioxalato que ocorre durante a fotorrespiração, e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol e fenóis (AEBI, 1984; IGAMBERDIEV; LEA, 2002). A enzima é preferencialmente encontrada nos peroxissomos, mas também pode estar presente em mitocôndrias e no citoplasma (MONTAVON et al., 2006).

Na literatura específica, tanto a tolerância como a resistência aos

herbicidas inibidores da PROTOX, em diversas espécies, pode ocorrer através de vários mecanismos como absorção reduzida, rápida metabolização, aumento da concentração da enzima PROTOX, alteração do local alvo, mutação em genes (DAYAN et al., 1996; DAYAN et al., 1997; WARABI et al., 2001; THOMAS et al., 2005; PATZOLDT et al., 2006; SILVA et al., 2007). No entanto, não se encontram trabalhos que mostrem a atividade das enzimas antioxidantes - SOD, POD e CAT – como possíveis mecanismos envolvidos na resistência em plantas daninhas aos herbicidas inibidores da PROTOX.

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar as atividades das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase, em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e com resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX, pela aplicação de herbicidas inibidores da PROTOX; determinar se estas enzimas estão envolvidas no mecanismo de resistência aos inibidores da PROTOX.

#### 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho consistiu de duas etapas, que foram realizadas em casa de vegetação e no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR Câmpus Pato Branco.

Na primeira etapa, foram inicialmente obtidas sementes pré-germinadas dos biótipos de *Euphorbia heterophylla* (EPHHL) Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira, Vilhena e Suscetível (S) em caixas gerbox contendo folhas de papel germitest, em câmara de crescimento. As sementes foram pré-germinadas à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, quando as plântulas atingiram 3 a 5 cm, foram transplantadas para vasos com volume de 5 dm<sup>3</sup>, preenchidos com solo e irrigados diariamente. A aplicação dos herbicidas seguiu os mesmos procedimentos realizados no experimento de resposta às doses dos inibidores da PROTOX (Capítulo 02). Os herbicidas foram aplicados sobre as plantas com duas folhas verdadeiras, no dia 06 de maio de 2013.

Os tratamentos utilizados para as atividades das enzimas para o biótipo S foram arrançados em um fatorial 5 x 4, constituído pelos fatores herbicidas inibidores da PROTOX [fomesafen (difeniléteres), flumiclorac (ftalamidas), carfentrazone (triazolinonas), oxadiazon (oxadiazol) e saflufenacil (pirimidinedione)], e suas proporções (0x, 0,16x, 0,41 e 1x), correspondentes às concentrações de 0,

40, 102, 250 g i.a.ha<sup>-1</sup> de fomesafen; de 0, 10, 25 e 60 g i.a.ha<sup>-1</sup> de flumiclorac; de 0, 5, 12 e 30 g i.a.ha<sup>-1</sup> de carfentrazone; de 0, 160, 410 e 1000 g i.a.ha<sup>-1</sup> de oxadiazon; e de 0, 6, 14 e 35 g i.a.ha<sup>-1</sup> de saflufenacil.

Os tratamentos dos biótipos resistentes (R) foram arranjados em fatorial 4 x 5 x 4, sendo, respectivamente, os fator biótipos (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena), herbicidas (os mesmos utilizados para o biótipo S) e suas proporções (0x, 1x, 3,1x, 9,4x) correspondentes às concentrações de 0, 250, 766 e 2345 g i.a.ha<sup>-1</sup> de fomesafen; 0, 60, 184 e 563 g i.a.ha<sup>-1</sup> de flumiclorac; 0, 30, 92 e 281 g i.a.ha<sup>-1</sup> de carfentrazone; de 0, 1000, 3063 e 9379 g i.a.ha<sup>-1</sup> de oxadiazon; e de 0, 35, 107 e 328 g i.a.ha<sup>-1</sup> de saflufenacil.

As análises bioquímicas iniciaram-se com a coleta de amostras da parte aérea das plântulas de EPHHL cultivadas em casa de vegetação. As coletas ocorreram nos momentos 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) dos tratamentos, através do corte das plantas rente ao solo, com imediata identificação, envolvimento em papel alumínio e congelamento em nitrogênio líquido (-196°C). Após, foram levadas ao laboratório, onde foram armazenadas em freezer a -40 °C, para posteriores determinações das atividades das enzimas SOD, CAT e POD.

Para a obtenção do extrato protéico/enzimático, foi utilizado de 0,2 a 1,0 g de material vegetal de cada tratamento, macerado em almofariz (previamente resfriado em geladeira), com nitrogênio líquido. Adicionaram-se 6 mL de tampão de extração (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 contendo 0,372 g de EDTA + 1 g PVPP) para cada 1 g de material e homogeneizou-se. Após, centrifugou-se por 15 minutos, a 12.000 rpm a 4 °C, utilizando-se o sobrenadante para os ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da fotoredução do cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT). Alíquotas de 50 µL do extrato enzimático foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8, com 100 nM de EDTA, 13 mM de metionina, 75 µM de NBT e 2 µM de riboflavina, sendo esta solução preparada em condição de mínima iluminação. A reação foi conduzida a 25 °C, em câmara de reação, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pelo desligamento das luzes e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu 1800 UV) a 560 nm. Os controles (100% de fotoredução) receberam todos os reagentes, exceto a amostra (extrato enzimático) e

foram submetidos à luz para a determinação da fotoredução total do NBT. Uma unidade de atividade (UA) foi considerada como a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotoredução do NBT em comparação com o meio de reação sem o extrato enzimático. A atividade específica da SOD foi expressa em  $U \mu\text{g}^{-1}$  de proteína. Esta metodologia foi adaptada de Giannopolitis; Ries (1977); Beauchamp; Fridovich (1971) e Del Longo et al. (1993).

A atividade da enzima POD (EC 1.11.1.7), foi analisada com a adição, em cubeta, de 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0, contendo para cada 100 mL de tampão 250  $\mu\text{L}$  de guaiacol 0,2 M e 306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio, e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. A atividade foi determinada pelo aumento da absorbância a 470 nm, a 30 °C por 3 min, em intervalos de 60 segundos. Os resultados foram expressos em variação de unidades de absorbância ( $UA \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), de acordo com o método descrito por Lusso; Pascholati (1999) com modificações.

Para quantificar a CAT (CAT, EC 1.11.1.6), adicionaram-se, em cubeta, 900  $\mu\text{L}$  da solução de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0, contendo peróxido de hidrogênio (12,5 mM) e 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, a 30 °C. A atividade enzimática foi determinada pela queda da absorbância, a 240 nm, por 3 minutos, em intervalos de 60 segundos, e calculada com base no fator de extinção de  $36 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , expresso em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1}\mu\text{g} \text{proteína}^{-1}$ , de acordo com o método descrito por Haver; McHale (1987) e Anderson et al. (1995) com modificações.

Os dados foram submetidos à análise da variância, pelo teste F ( $p < 0,05$ ). As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

Os comportamentos da enzima superóxido dismutase (SOD), conforme as doses dos herbicidas saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone, flumiclorac e fomesafen, utilizados para os biótipos testados são apresentados nas Figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5.

Para o herbicida saflufenacil, em geral, observaram-se que as maiores



atividades da SOD, para as doses testadas, foram obtidas 48 e 72 HAA (Figura 5.1). Os biótipos Vitorino e Bom Sucesso do Sul apresentaram atividades máximas, para as condições do ensaio, com a dose 0x na avaliação efetuada 24 HAA. Com o decorrer do tempo, após aplicação, verificou-se que, em relação às testemunhas, os demais tratamentos demonstraram valores muito próximos ou levemente superiores ao 0x. Isto, provavelmente, pode ser decorrente da característica genética destes biótipos de apresentar alta atividade da SOD constitutivamente (Figura 5.1 D e E) ou indução devida ao estresse mecânico, já que não se descarta o aumento da atividade em função da coleta das plantas.

Já os biótipos Medianeira e Vilhena (Figura 5.1 B e C) apresentaram atividade da SOD crescente e/ou constante pelas doses utilizadas no decorrer do tempo após a aplicação, com máximas atividades em 72 HAA. A maior atividade da enzima foi observada para o biótipo Bom Sucesso do Sul (948 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína), na dose 0x em 24 HAA (Figura 5.1 E).

O biótipo S apresentou, quando submetido às menores doses, atividade semelhante à testemunha (sem herbicida), porém, quando as doses foram elevadas para 0,41x e 1x, ocorreram aumentos, com picos detectados em 48 HAA (Figura 5.1 A), com a maior atividade observada com a dose 1x, (765 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína), o mesmo ocorrendo com o biótipo Bom Sucesso do Sul (828 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína). A similaridade do comportamento do S e Bom Sucesso do Sul possivelmente se deve à maior produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por estes biótipos, e a maiores concentrações iniciais da enzima. Já os biótipos Medianeira, Vilhena e Vitorino apresentaram máximas atividades, nesta mesma dose, mas após um período maior, ou seja, 72 HAA, de 919 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, 756 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína e 818 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente.

Avaliando os valores de atividade da SOD obtidos para a dose 1x, os biótipos R Bom Sucesso do Sul, Vitorino e Medianeira, apresentaram atividades da SOD superiores ao biótipo S. Esta maior atividade da SOD para os três biótipos R dá indícios do envolvimento da enzima na expressão da resistência para o saflufenacil.

De maneira simplificada, para o herbicida saflufenacil, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da SOD, em ordem decrescente como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > Vilhena > S.

As atividades da SOD dos biótipos R e S, pela aplicação do saflufenacil, são coerentes com os valores de  $C_{50}$  do controle visual (Capítulo 02). Os valores de  $C_{50}$ , em ordem decrescente, foram: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > Vilhena > S. Os biótipos que apresentaram maior atividade da SOD com aplicação de saflufenacil, também apresentaram maior  $C_{50}$ , fato que pode estar relacionado com a capacidade das enzimas antioxidantes em combater o estresse oxidativo provocado pela aplicação herbicida.

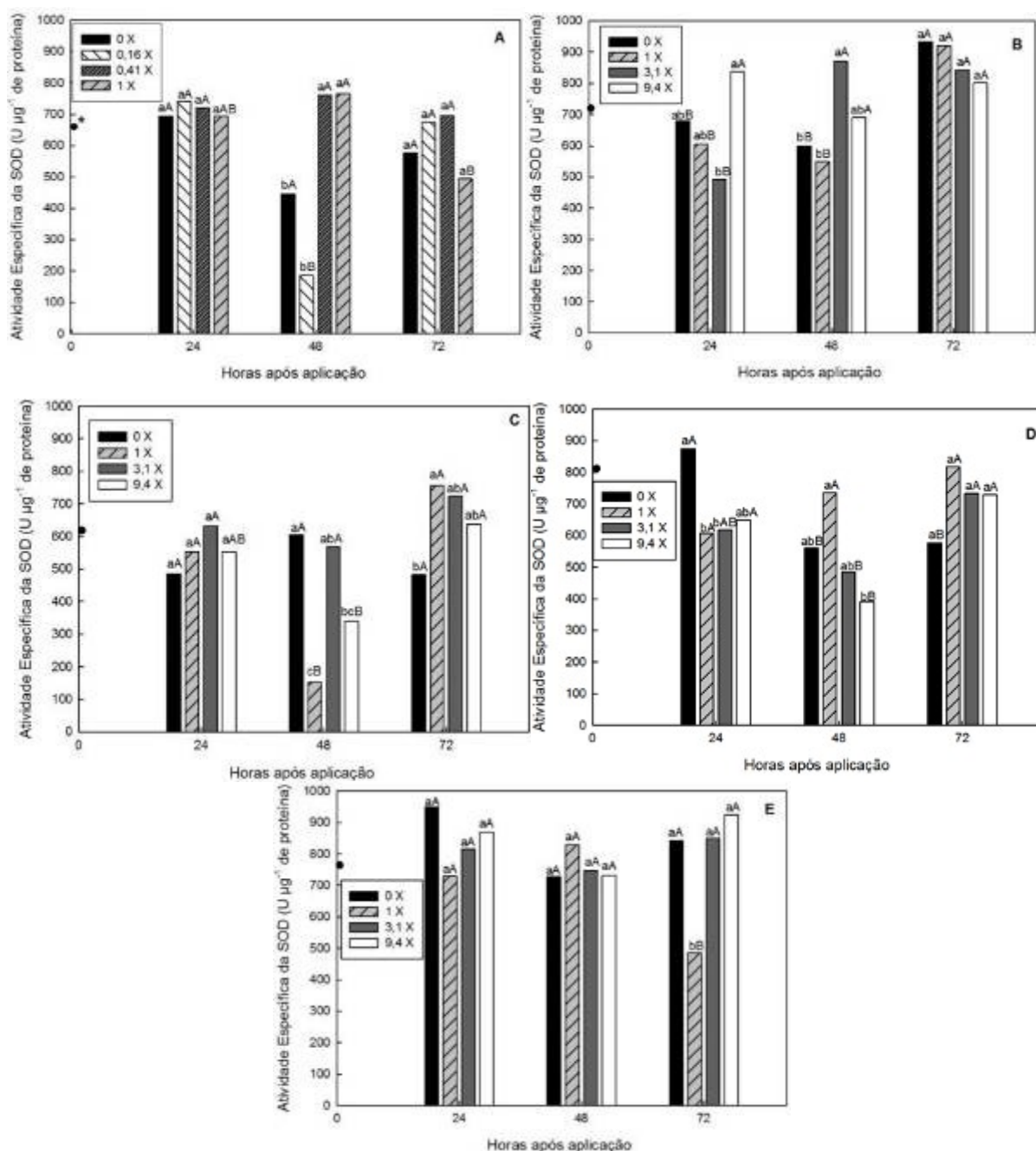


Figura 5.1 - Atividade da enzima SOD (U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* A atividade média dos biótipos, antes da aplicação dos herbicidas.

Para o herbicida oxadiazon (Figura 5.2), os biótipos Vitorino e Bom Sucesso do Sul, como observado com o saflufenacil, apresentaram as máximas atividades da SOD também na dose 0x 24 HAA (Figura 5.2 D e E). Os demais biótipos tiveram aumentos variáveis das atividades, sendo que as doses foram determinantes para se obter tais resultados em 24 e 48 HAA (Figura 5.2 A, B e C). A maior atividade da enzima no sistema foi observada no Vilhena (1321 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína), na dose 1x 48 HAA (Figura 5.2 C).

Com a dose 1x o biótipo S apresentou máxima atividade da SOD em 24 HAA, com redução posterior (Figura 5.2 A). Para o biótipo Vilhena, com esta mesma dose a atividade máxima foi observada em 48 HAA (Figura 5.2 C), já para o Medianeira, Vitorino e Bom Sucesso do Sul, as máximas atividades, na mesma, ocorreram 72 HAA (Figura 5.2 B, D e E). No biótipo S com a dose 1x foi verificada a maior e mais repida atividade, quando comparada aos biótipos R, Medianeira, Vitorino e Bom Sucesso do Sul. Isto, possivelmente, devido o sistema antioxidante do biótipo S ser ativado rapidamente, porém, não foi suficiente para permanecer tão ativo por períodos maiores, o que parece indicar que após esta curta resposta, as enzimas responsáveis não conseguem livrar totalmente as células da ERO, levando-as ao colapso.

O fato de tanto os biótipo S quanto R apresentarem alta atividade da SOD nas primeiras horas de avaliação mostra que tais enzimas são a primeira linha de defesa das plantas, independente do fenótipo resistência. No caso das plantas S, a SOD refletiu o efeito do herbicida, que foi capaz de aumentar a atividade enzimática, resultando em maior produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual pode ter sido um dos responsáveis pela resposta de hipersensibilidade, provocando alto nível de mortalidade celular o que resultou nas lesões foliares observadas nas plantas.

De maneira simplificada, para o herbicida oxadiazon, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração a atividade média da SOD, em ordem decrescente como: Bom Sucesso do Sul > Vilhena > S > Medianeira > Vitorino.

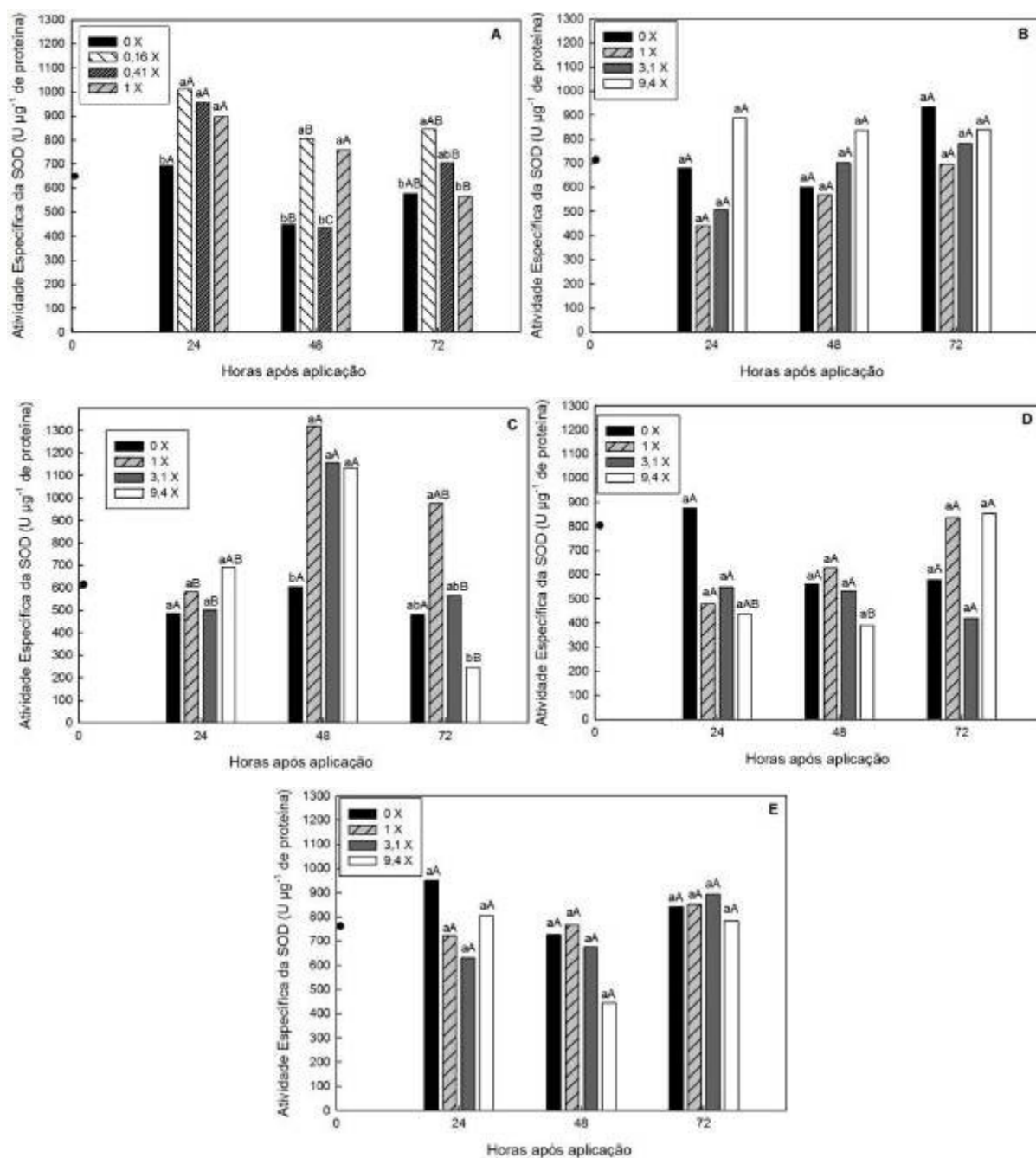


Figura 5.2 - Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), 24, 48 e 72 HAA de oxadiazon. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o herbicida carfentrazone, os biótipos S, Medianeira e Bom Sucesso do Sul, apresentaram pouco ou mínimo estímulo deste herbicida para a atividade da SOD, visto que as atividades da SOD não se diferenciaram da testemunha, pelas doses aplicadas nos períodos avaliados (Figura 5.3 A, B e E). No entanto, não se descarta a indução do sistema de defesa, já que não foram avaliados períodos inferiores as 24 HAA e posteriores as 72 HAA. Os biótipos

Vilhena e Vitorino apresentaram variações de atividade da SOD pelas doses aplicadas, sendo alcançados os picos de atividades 48 e 72 HAA, respectivamente (Figura 5.3 C e D).

Assim, não houve um comportamento padrão de atividade da SOD para as diferentes doses e períodos de tempo, dentro de cada biótipo. De uma forma geral, os biótipos R não apresentaram atividade de SOD diferente da apresentada pelo biótipo S, com exceção da superioridade dos biótipos Vilhena e Vitorino.

Quanto a valores, a maior atividade enzimática no sistema foi observada para o biótipo Vilhena ( $1494 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), na dose  $9,4 \times 48$  HAA (Figura 5.3 C), seguido por Vitorino ( $1490 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) na mesma dose, mas após período de tempo maior, ou seja, 72 HAA (Figura 5.3 D).

Avaliando a atividade média da SOD dos biótipos na dose 1x, verificou-se que Medianeira e Vitorino apresentaram atividades médias para esta dose muito semelhantes ao S (Figura 5.3 A, B e D), enquanto Bom Sucesso do Sul (Figura 5.3 E) apresentou atividade pouco maior que do S. Já em Vilhena (Figura 5.3 C) a atividade elevada da enzima para esta dose em 48 HAA, não se manteve com o tempo.

Para o herbicida oxadiazon, os biótipos podem ser classificados em ordem decrescente, levando-se em consideração os valores da SOD, como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vilhena > Vitorino > S. Observa-se que todos os biótipos R para este herbicida apresentam atividade da SOD superior ao biótipo S.

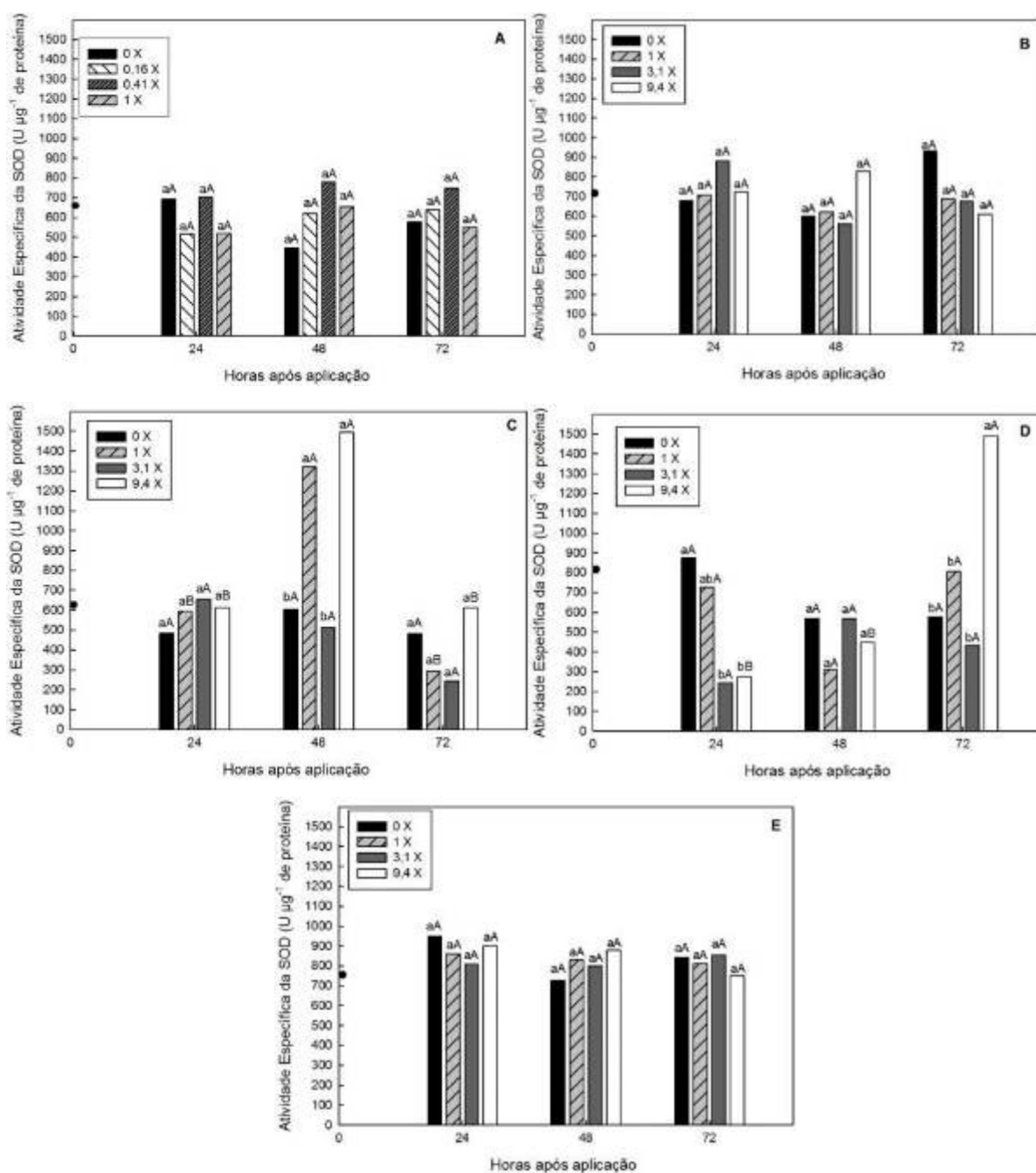


Figura 5.3 - Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), 24, 48 e 72 HAA de carfentrazone. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o herbicida flumiclorac (Figura 5.4), as máximas atividades para os biótipos Medianeira, Vilhena e Vitorino (Figura 5.4 B, C e D) ocorreram 48 e 72 HAA, no entanto, para os biótipos S e Bom Sucesso do Sul (Figura 5.4 A e E) as respostas foram mais rápidas, com altas atividades em 24 HAA.

Para a dose 1x, os biótipos S, Medianeira e Vilhena apresentaram máximas atividades de 911, 914 e 678  $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente, em 24

HAA (Figura 5.4 A, B e C), enquanto Vitorino e Bom Sucesso do Sul tiveram suas máximas atividades, de 891 e 800 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente, para a mesma dose, em 72 HAA (Figura 5.4 D e E).

Traduzindo as atividades em valores, nas condições do ensaio, o biótipo Vilhena foi o que se destacou, apresentando a máxima atividade, de 1250 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Figura 5.4 C) na dose 9,4x em 72 HAA, seguido por Bom Sucesso do Sul (950 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína), na dose 0x em 24 HAA (Figura 5.4 E).

É interessante notar que o biótipo Vilhena (Figura 5.4 C), apesar de ter apresentado a máxima atividade da SOD, foi também o que apresentou os menores valores e a menor atividade média. Isto pode significar que este herbicida não tem ação ativadora eficiente da SOD ou que a resposta enzimática foi tão eficiente que ocorreu em período anterior aos analisados neste trabalho.

De maneira simplificada, para o herbicida flumiclorac, os biótipos S e R podem ser classificados em ordem decrescente, levando-se em consideração os valores médios da SOD, como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > S > Vitorino > Vilhena.

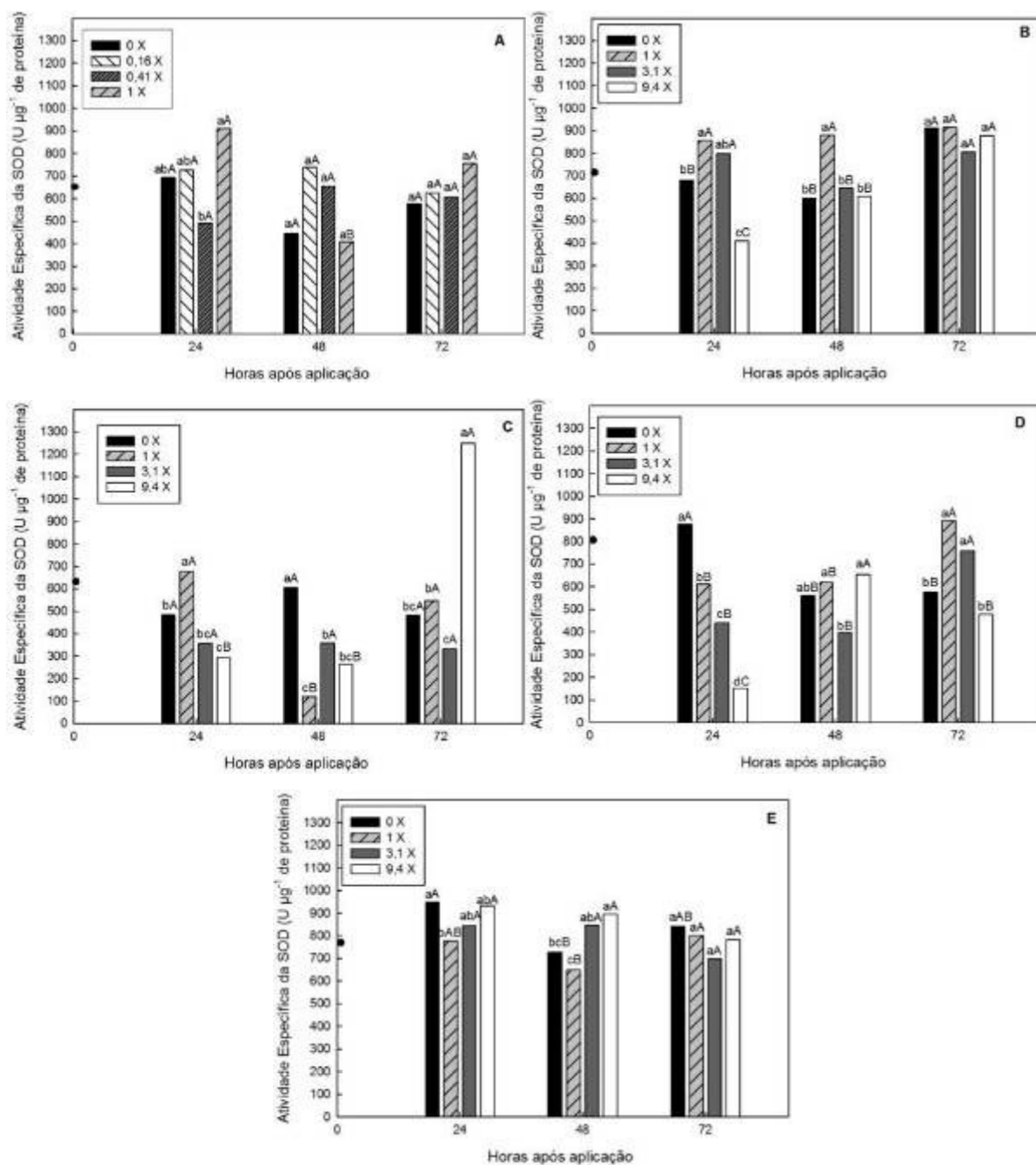


Figura 5.4 - Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), 24, 48 e 72 HAA de flumiclorac. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com o herbicida fomesafen (Figura 5.5), no geral, altas atividades de SOD foram induzidas já em 24 HAA, porém, as doses capazes desta ativação variaram conforme os biótipos. Com o biótipo S (Figura 5.5 A), observou-se que as menores doses induziram respostas enzimáticas rápidas.

Para o Medianeira (Figura 5.5 B), as atividades da SOD em 24 e 48 HAA em todas as doses de fomesafen testadas, foram superiores à testemunha, e



em 72 HAA não houve diferença com relação à testemunha, demonstrando que a ativação da SOD ocorreu em períodos inferiores as 48 HAA.

A atividade constante da SOD com o decorrer do tempo após aplicação, como observado para os biótipos Medianeira e Bom Sucesso do Sul, por exemplo, mostrou ter ocorrido um equilíbrio entre substrato e concentração enzimática, talvez atingindo o máximo para os sistemas dos biótipos, nas condições do ensaio. Para arroz submetidos à aplicação do herbicida penoxsulam, Langaro et al. (2013) verificaram que a SOD, a partir das 16 horas após a aplicação do tratamento, apresentou atividade constante, com o decorrer do tempo, não havendo mais estímulo da enzima pela ação herbicida. Assim, a constância de atividade observada em alguns tratamentos após aplicação do carfentrazone, como nos biótipos S e Bom Sucesso do Sul (Figura 5.3 A e E), pode ser devido os períodos avaliados não coincidirem com a taxa crescente da atividade da SOD, mas sim com o período de estabilização da atividade.

Os biótipos Vilhena e Bom Sucesso do Sul (Figura 5.5 C e E) apresentaram atividades crescentes para a dose 1x em 24 e 72 HAA, porém, permaneceram constantes quando as doses foram aumentadas para 3,1x e 9,4x. Vitorino (Figura 5.5 D) apresentou comportamento diferenciado, com a atividade da SOD da testemunha em 24 HAA não diferenciando da atividade em 72 HAA, quando se aplicou a dose 9,4x, havendo queda da atividade em todas as doses em 48 HAA.

Para a dose 1x, os biótipos S e Vitorino apresentaram máximas atividades de 908 e 766 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente, já em 24 HAA (Figura 5.4 A e D). Medianeira atingiu máxima atividade de 905 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína para esta mesma dose, 48 HAA (Figura 5.4 B), enquanto o Vilhena e Bom Sucesso do Sul, tiveram suas máximas atividades, de 900 e 927 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente, para mesma dose em 72 HAA (Figura 5.4 C e E).

Para o fomesafen, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da SOD considerando todas as doses, em ordem decrescente como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > S > Vilhena > Vitorino.

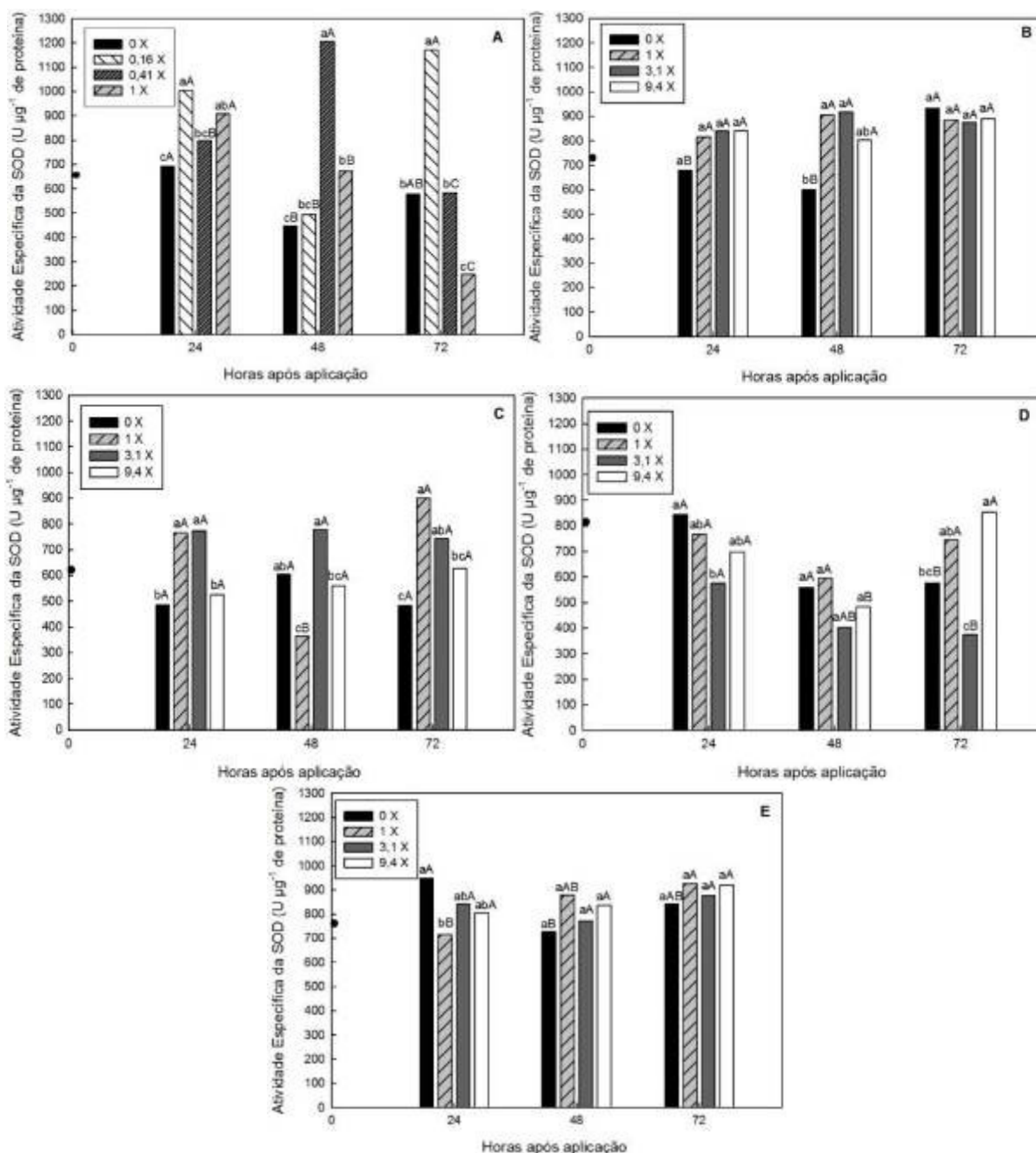


Figura 5.5 - Atividade da enzima SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), 24, 48 e 72 HAA de fomesafen. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o biótipo S, considerando-se as médias das doses dos herbicidas testados, a maior atividade da SOD em ordem decrescente foi: fomesafen > oxadiazon > flumiclorac > saflufenacil > carfentrazone.

Para o biótipo Medianeira, a maior atividade da SOD foi: saflufenacil > flumiclorac > oxadiazon > carfentrazone > fomesafen. A maior atividade da SOD para o biótipo Vilhena foi a seguinte: oxadiazon > fomesafen > flumiclorac >

saflufenacil > carfentrazone.

A maior atividade da SOD, considerando-se as médias de doses para o biótipo Vitorino, ocorreu na seguinte ordem: saflufenacil > oxadiazon > flumiclorac > carfentrazone > fomesafen. E para o Bom Sucesso do Sul, ficaria a seguinte ordem: flumiclorac > oxadiazon > fomesafen > carfentrazone > saflufenacil. Isto mostra que cada biótipo apresenta uma resposta da SOD, dependendo do produto aplicado.

As plantas têm sistemas de defesa bem desenvolvidos contra espécies reativas de oxigênio (ERO), que envolvem tanto a capacidade de limitar a formação de EROs, bem como promover a sua remoção. Sob condições sem estresse, a formação e a remoção de  $O_2^{\cdot-}$  estão em equilíbrio. Dentro de uma célula, as superóxido dismutases (SOD's) constituem a primeira linha de defesa contra estas moléculas (ALSCHER et al. 2002), em particular do  $O_2^{\cdot-}$  transformando-o em compostos menos reativos ( $H_2O_2$ ) (ASADA, 1999).

Como observado nos biótipos testados, o efeito dos herbicidas sobre a SOD foi diferenciado. Pyon et al. (2004), em estudos com biótipos de *Conyza canadensis* R e S ao paraquat, observaram que as atividades da SOD, POD e CAT foram maiores no biótipo R do que no S. Apesar de indicar o envolvimento destas enzimas nos mecanismos de resistência ao paraquat em *C. canadenses*, os resultados do presente estudo com EPHHL apenas sinalizaram um pequeno envolvimento, porém, sem confirmar que a SOD seja uma via importante na determinação de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX.

Diversos trabalhos mostram correlações entre resistência de plantas ao estresse oxidativo, gerado por herbicidas como o paraquat e a atividade da SOD (DODGE, 1971; MATTERS; SCANDALIOS, 1986; MALAN et al., 1990; PASTORI; TRIPPI, 1992; KRAUS; FLETCHER, 1994; CASANO et al. 1999). Estudos demonstram que a SOD tem ação contra o estresse oxidativo induzido pelo herbicida oxyfluorfen em plantas de soja, mesmo mecanismo de ação dos herbicidas testados neste trabalho (CATANEO et al., 2005).

A diminuição da atividade da SOD, com o decorrer do tempo após aplicação, como observado para o biótipo S, na dose 1x do saflufenacil, do oxadiazon e do fomesafen (Figuras 5.1 A, 5.2 A e 5.5 A) e Bom Sucesso do Sul, na dose 1x do saflufenacil (Figura 5.1 E), pode ser atribuída a inativação da enzima por  $H_2O_2$  que é produzido em diferentes compartimentos celulares onde a SOD catalisa a dismutação dos radicais  $O_2^{\cdot-}$  (HASSAN; ALLA 2005).

A SOD no sistema de defesa antioxidante pode depender, pelo menos em parte, do efeito de remoção de  $H_2O_2$  do sistema. Além disso, quando a síntese de proteínas for suprimida, o estresse oxidativo causa uma diminuição progressiva da atividade da SOD. É possível que EROs geradas sob tais condições possam inativar e degradar SOD (CASANO et al., 1997). Enquanto o aumento da atividade da SOD, pode ser atribuída a uma maior produção de  $O_2^{\cdot-}$  (JANICKA et al., 2008), devido ao estresse oxidativo gerado pela ação herbicida.

O surgimento de danos às plantas, como os observados no biótipo S pela aplicação dos herbicidas inibidores da PROTOX (Capítulo 02), podem ocorrer pela diminuição da capacidade de decompor o  $H_2O_2$ , decorrente de baixa atividade da CAT e da POD, que ocorrem em passos seguintes à ativação da SOD.

Os biótipos estudados apresentaram respostas variadas das atividades da SOD pela aplicação das doses dos herbicidas testados. Se classificar estes biótipos segundo as atividades médias obtidas para os cinco herbicidas testados, a classificação seria a seguinte: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > S > Vitorino > Vilhena. Isto demonstra que os biótipos Bom Sucesso do Sul e Medianeira que são R, em termos gerais, apresentam atividade da SOD superior ao biótipo S, sendo esta alta atividade relacionada posterior aos baixos controles visuais e altos valores de  $C_{50}$  obtidos. Mas o biótipo S apresentou atividade da SOD superior aos biótipos R Vitorino e Vilhena, a qual não está relacionada aos menores níveis de controle e maiores  $C_{50}$  destes biótipos. Assim, esta atividade da SOD superior no biótipo S, não significa resistência, mas sim que este biótipo pode apresentar maior capacidade de sintetizar esta enzima mais rapidamente ou ativa-lá de forma eficiente quando ocorre o estresse oxidativo pela ação herbicida.

No entanto, o fato da alta atividade da SOD para o biótipo S, não relacionar com os resultados de controle, pode ser ao fato da SOD ser a primeira enzima da defesa contra os danos causados pelas EROs. Ela dismuta o  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , ou seja, vai gerar uma outra molécula, que se não for combatida causará danos às células. Assim, elevados níveis de controle obtidos pela ação dos herbicidas no S, mesmo apresentando alta atividade da SOD, pode estar relacionada à produção de  $O_2^{\cdot-}$  excessiva, em relação a concentração de enzima ou pelo acúmulo, principalmente de outras EROs produzidas nas etapas posteriores e cujas enzimas não são tão eficientes e/ou são produzidas mais lentamente ou em quantidades insuficientes. Os radicais  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , em geral, não são tóxicos, porém,

quando em excesso são convertidos em radicais hidroxilas, um radical muito mais danoso (CHANDRU et al., 2003), assim, um combate não eficiente contra o  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , gerará muito mais danos.

### 5.5.2 Peroxidase (POD)

As peroxidases (PODs) são enzimas ativadas sequencialmente após as SOD, assim como CAT na via do mecanismo oxidativo. Nos ensaios com os herbicidas, foram verificadas diferenças no comportamento da POD, conforme a dose aplicada dos herbicidas saflufenacil, oxadiazon, carfentrazone, flumiclorac e fomesafen e os biótipos testados (Figuras 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10).

Em geral, para o herbicida saflufenacil, as maiores atividades da POD foram obtidas com a dose 1x em 72 HAA (Figura 5.6). Todos os biótipos apresentaram aumentos nas atividades da POD, comparativamente às testemunhas, desde a primeira avaliação efetuada, 24 HAA. A testemunha demonstrou que houve aumento da atividade, ao longo do tempo, mesmo sem aplicação dos herbicidas (Figura 5.6 A, B, C, D e E). No entanto, também foi constatado incremento da atividade da POD com as aplicações de herbicidas, em relação à testemunha, o que indica o papel destas enzimas em debelar os radicais livres formados.

A máxima atividade do sistema ocorreu para o biótipo Bom Sucesso do Sul ( $7,4 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), na dose 1x, 72 HAA, seguido por Vilhena ( $6,5 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) e Medianeira ( $5,7 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), nas mesmas condições (Figura 5.6 B, C e E).

O biótipo S, assim como os biótipos R, respondeu com aumento na atividade enzimática na dose de 1x, com pico de atividade nesta dose para todos atingidos, em 72 HAA (Figura 5.6). Para esta dose, as atividades máximas alcançadas para os biótipos podem ser expressas na seguinte ordem decrescente: Bom Sucesso do Sul ( $7,4 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), Medianeira ( $5,7 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), Vilhena ( $6,5 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), S ( $4,5 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas), Vitorino ( $3,1 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas). Isto mostra maior atividade da POD dos biótipos R, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena, que o biótipo S, em resposta a aplicação da dose 1x do saflufenacil.

Em uma sequência metabólica, a POD e a CAT são enzimas que atuam na defesa vegetal na quebra da molécula de  $H_2O_2$  e espera-se que algumas

plantas, conforme sua capacidade de resposta a estresses ativem tais mecanismos em tempos relativamente curtos, o que parece ocorrer, no caso da POD, para os biótipos Medianeira e Bom Sucesso do Sul, cujas atividades persistiram por um período maior.

A POD dos biótipos R, no geral, apresentou aumento da atividade com o decorrer do tempo após aplicação do saflufenacil, para as menores doses. As maiores doses apresentam redução da atividade com o decorrer do tempo após aplicação do herbicida. Isto identifica a diferença de períodos de estímulo que as diferentes doses têm sobre a enzima, que quanto maiores o estímulo ocorreu mais precocemente, isto provavelmente devido ao alto nível de estresse oxidativo desencadeado pela maior concentração de moléculas herbicidas. Já para o biótipo S, ocorre o inverso, demonstrando que a dose maior (1x) apresentou pico de atividade mais tardiamente. Com isso verifica-se que a dose 1x estimulou a POD de forma semelhante nos períodos avaliados para os biótipos R e S.

A análise das atividades médias da POD nos biótipos R e S após aplicação de saflufenacil permite estabelecer a seguinte ordem: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > S > Vilhena. Isto demonstra que os biótipos R, no geral, com exceção do Vilhena, apresentaram maior atividade de POD em relação ao biótipo S.

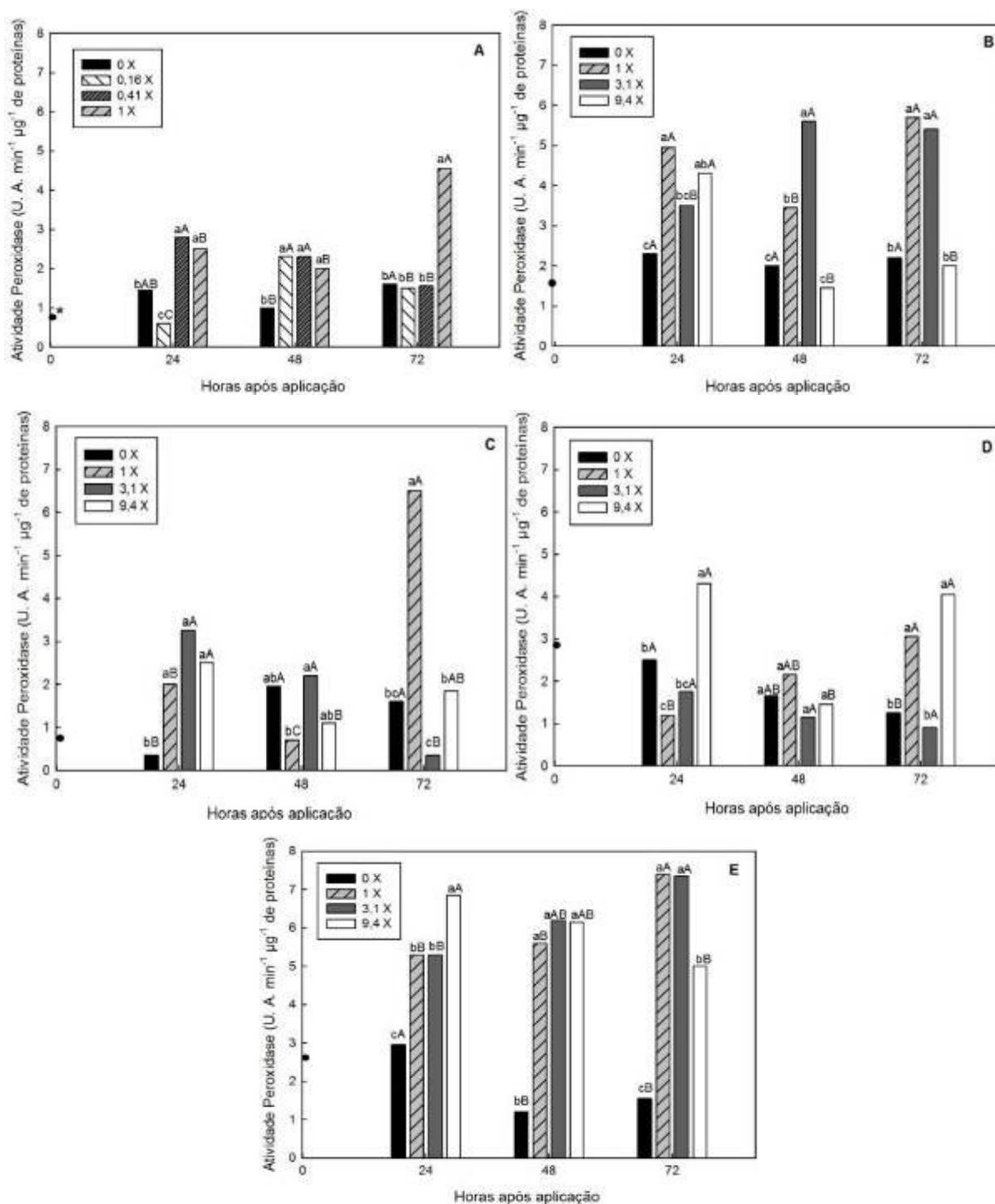


Figura 5.6 - Atividade da enzima POD (UA min<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* A atividade média dos biótipos, antes da aplicação dos herbicidas.

A atividade da POD, após aplicação de carfentrazone (Figura 5.7), apresentou-se menos ativa que o obtido com saflufenacil (Figura 5.6), nos biótipos R estudados. As maiores atividades de POD foram induzidas em tempos variáveis e as doses capazes de determinar a ativação variaram conforme os biótipos (Figura 5.7).

A maior atividade da POD do sistema, novamente, foi obtida para o biótipo Bom Sucesso do Sul ( $7,3 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) na dose de 1x, 24 HAA (Figura 5.7 E). Para o Medianeira e o Bom Sucesso do Sul (Figura 5.7 B e E), a atividade da enzima foi rapidamente induzida, reduzindo com o decorrer do tempo após aplicação.

O biótipo Vilhena (Figura 5.7 C) apresentou as menores atividades comparadas aos demais biótipos. No caso deste, observou-se que respondeu bem com o saflufenacil, mas não se manteve responsivo para o carfentrazone, assim como para Vitorino, mesmo apresentando aumentos em determinadas doses e períodos de tempo, mas com valores muito abaixo dos obtidos com o saflufenacil (Figura 5.7 C e D).

Já no biótipo S, a atividade máxima da POD foi semelhante à obtida com o saflufenacil ( $4,6 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) e nas mesmas condições, ou seja, com a dose 1x 72 HAA, sendo que este aumento foi gradual, ao longo do tempo (Figura 5.7 A). Para os biótipos R, avaliando esta mesma dose, verificou-se que os picos de atividade ocorreram para o Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vitorino já 24 HAA. Isto demonstra que há maior atividade da POD nos biótipos R, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vitorino, que no biótipo S, em resposta a aplicação da dose 1x do carfentrazone. O pequeno estímulo à POD do biótipo Vilhena em resposta a aplicação desta dose pode ser explicado pelo fato do período avaliado não coincidir com as máximas atividades ou este herbicida não estimula a atividade da POD neste biótipo.

A análise das atividades médias da POD nos biótipos R e S após aplicação de carfentrazone permite estabelecer a seguinte ordem: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > S > Vilhena. E novamente, com exceção do Vilhena, os biótipo R apresentaram maior atividade de POD em relação ao biótipo S.



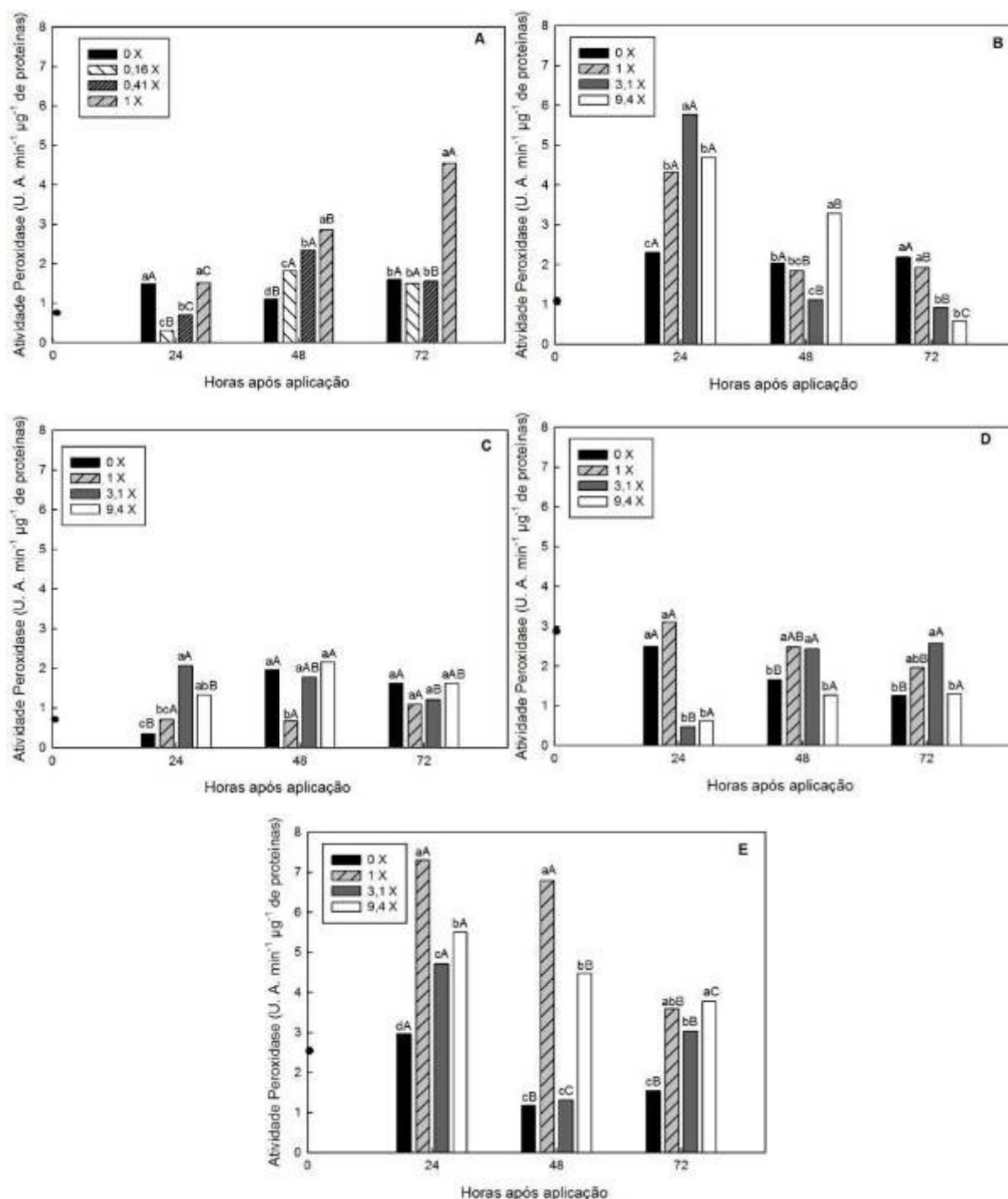


Figura 5.7 - Atividade da enzima POD (UA min<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de carfentrazone. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No ensaio com o herbicida flumiclorac, em geral, os maiores valores da atividade da POD foram observados, principalmente, em 48 e 72 HAA, no entanto, ocorreram variações conforme as doses empregadas em cada biótipo (Figura 5.8).

A maior atividade de POD do sistema foi observada para o biótipo

Medianeira ( $6,9 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) na dose 9,4x, 72 HAA (Figura 5.8 B), seguido por Bom Sucesso do Sul ( $6,7 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) na dose 3,1x (72 HAA) (Figura 5.8 E). Os biótipos Vilhena (Figura 5.8 C) e Vitorino (Figura 5.8 D), não se mantiveram responsivos ao flumiclorac como verificado para o saflufenacil (Figura 5.6 C e D), apesar de ocorrerem pequenas variações positivas de atividade em determinadas doses. Para o biótipo S (Figura 5.8 A), a máxima atividade obtida com o flumiclorac foi de  $5,2 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas, na dose 0,16 x, 48 HAA, sendo esta superior à obtida no mesmo período e com a mesma dose que carfentrazone e saflufenacil.

Para a dose 1x, observou-se para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vilhena e Vitorino, que elevada atividade da POD ocorre precocemente, 24 HAA, no entanto com valores muito superiores para o Bom Sucesso do Sul, comparativamente aos demais biótipos. O Medianeira apresentou máxima atividade para esta mesma dose 48 HAA, enquanto para o biótipo S, a atividade foi crescente com o decorrer do tempo, com máxima atividade 72 HAA. Isto demonstra resposta diferenciada para uma mesma dose, entre os biótipos testados.

Para o herbicida flumiclorac, os biótipos podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da POD, em ordem decrescente como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > S > Vilhena.

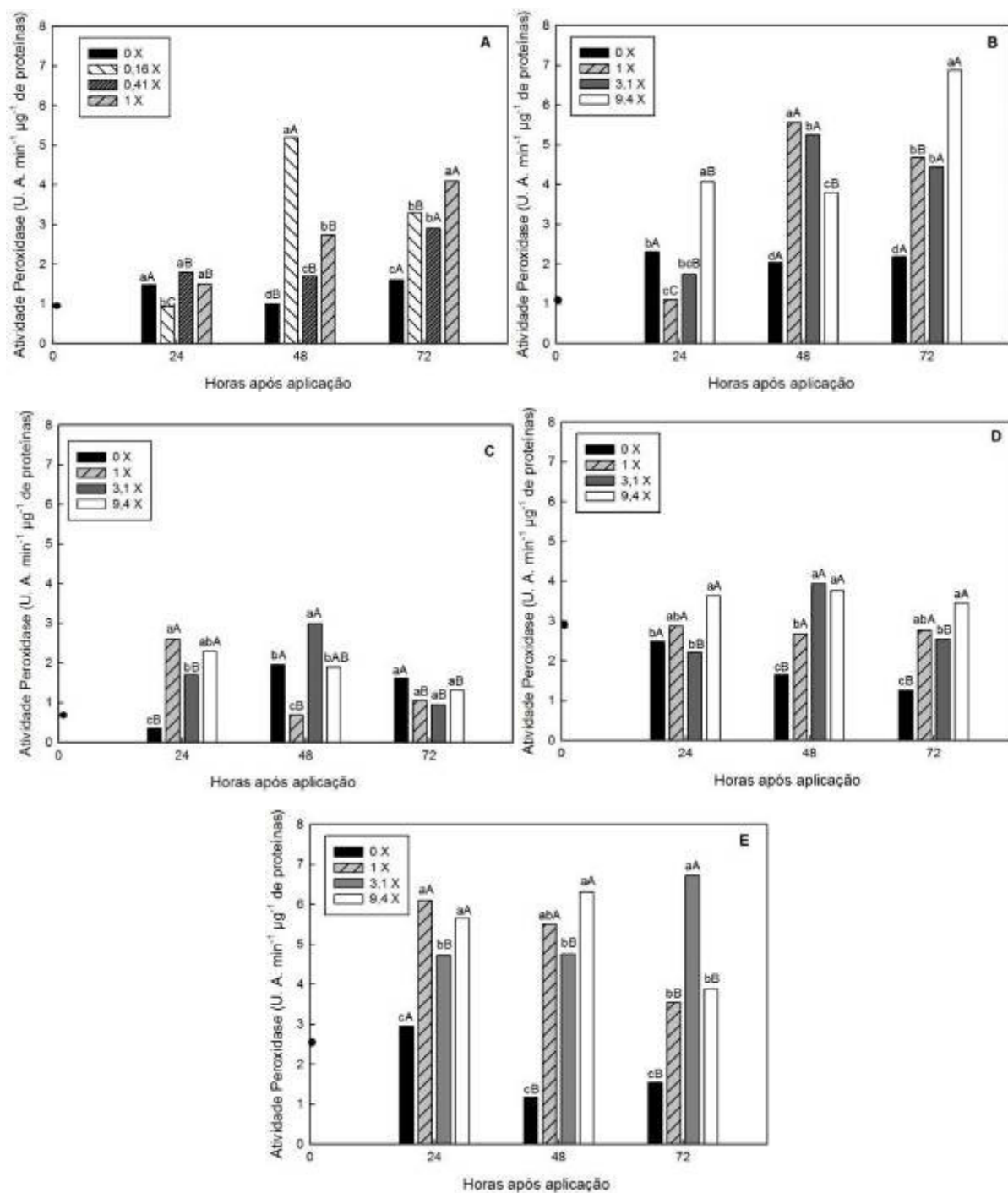


Figura 5.8 - Atividade da enzima POD (UA min<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de flumiclorac. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como se observa na Figura 5.9, os biótipos R testados em diferentes doses do oxadiazon responderam com elevação de atividade enzimática precocemente, 24 HAA (Figura 5.9 B, C, D e E), enquanto o biótipo S apresentou as máximas atividades para as doses testadas, mais tardiamente, 72 HAA (Figura 5.9 A). A maior atividade da POD no tratamento com oxadiazon foi observada para o

biótipo Medianeira ( $6,9 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) na dose  $9,4 \times 72 \text{ HAA}$  (Figura 5.9 B).

Para a dose 1x, o biótipo S apresentou máxima atividade de  $6,5 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas,  $72 \text{ HAA}$  (Figura 5.9 A). Os biótipos R, Vilhena, Vitorino e Bom Sucesso do Sul apresentaram máximas atividades de  $3,2 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas,  $4,9 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas e  $48 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas, respectivamente, para esta mesma dose,  $24 \text{ HAA}$  (Figura 5.9 C, D e E), enquanto o Medianeira teve sua máxima atividade, de  $5,5 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas, para esta dose  $48 \text{ HAA}$  (Figura 5.9 B). Comparando os biótipos, verificou-se que a atividade média da POD para a dose 1x é maior para o Vitorino seguido do Bom Sucesso do Sul, S, Medianeira e Vilhena, nesta ordem. Isto mostra que o biótipo S apresenta uma atividade superior da POD aos biótipos R, Medianeira e Vilhena, no entanto, esta não se mantém, visto que os resultados de controle para o biótipo S são superiores ao controle obtido pelos biótipos R. E os biótipos Bom Sucesso do Sul e Vitorino apresentam relação da atividade alta da POD com o baixo controle exercido pela ação herbicida.

Para o oxadiazon, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da POD, em ordem decrescente como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > S > Vilhena.

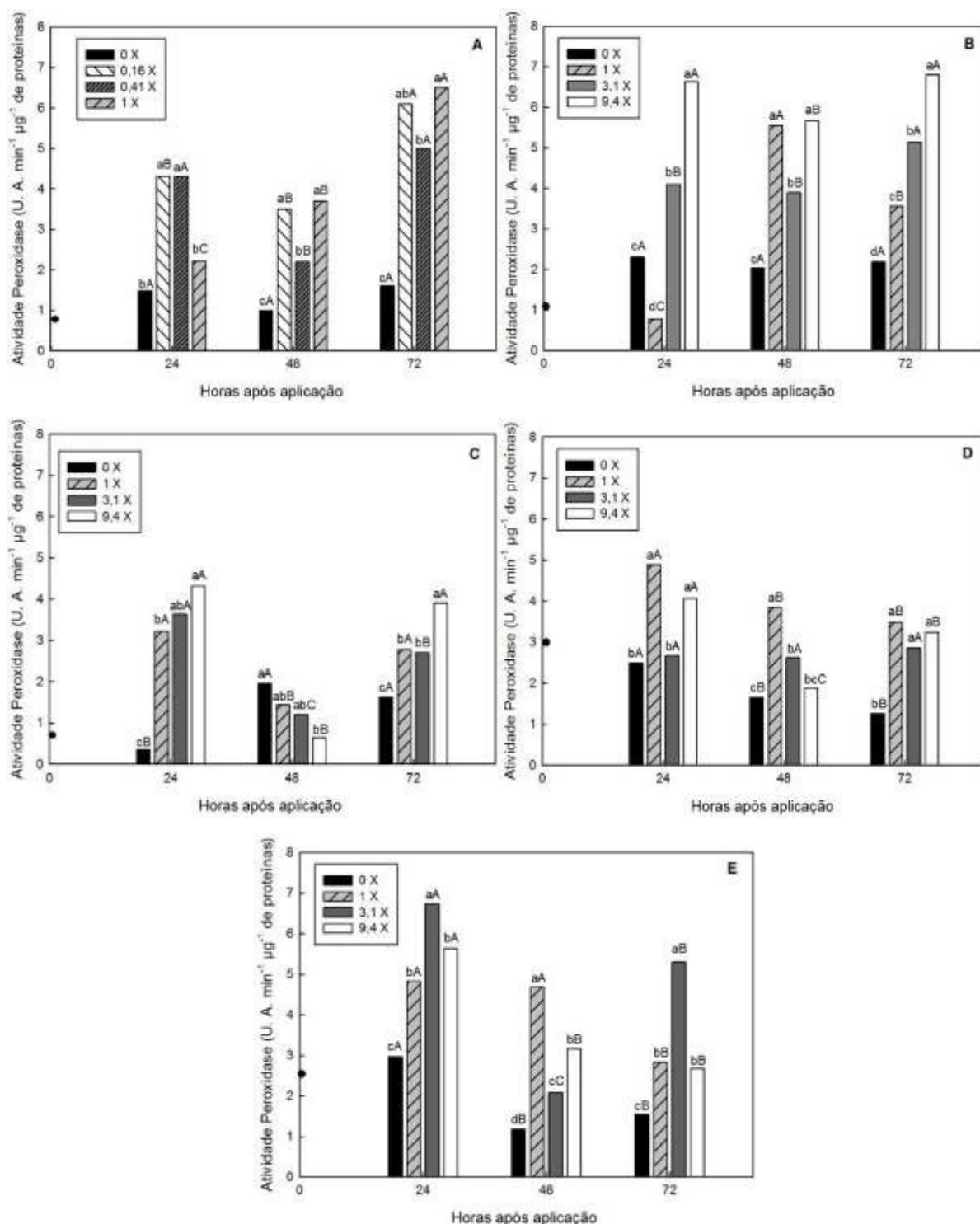


Figura 5.9 - Atividade da enzima POD (UA min<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de oxadiazon. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o herbicida fomesafen, em geral, a POD apresentou máximas atividades entre 48 e 72 HAA, variando conforme as doses utilizadas nos biótipos testados (Figura 5.10).

A máxima atividade da POD com o fomesafen foi observada para o

biótipo Vilhena ( $7,6 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) na dose 1x, 72 HAA (Figura 5.10 C), ao contrário do que se observou com os herbicidas carfentrazone (Figura 5.7 C), flumiclorac (Figura 5.8 C) e oxadiazon (Figura 5.9 C). Seguido do biótipo Bom Sucesso do Sul ( $7,2 \text{ UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas) na dose 9,4x 48 HAA (Figura 5.10 E).

Nota-se que o biótipo S também respondeu com aumento na atividade enzimática com a dose de 1x em 48 HAA (Figura 5.10 A). Já o biótipo Medianeira apresentou respostas variadas em função das doses, sendo que o maior valor da atividade enzimática foi observada com 9,4 vezes a dose comercial em 24 HAA, que foi muito similar à atividade resultante da aplicação da dose 1x, 48 e 72 HAA (Figura 5.10 B).

Comparando os biótipos R e S pela dose 1x, dose comum a todos, verificou-se que a atividade média da POD para esta dose foi maior para o Medianeira seguido do Vilhena, Bom Sucesso do Sul, S e Vitorino, nesta ordem.

Para o herbicida o fomesafen, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da POD, considerando todas as doses, em ordem decrescente como: Medianeira > Bom Sucesso do Sul > Vilhena > Vitorino > S. Isto mostra que os biótipos R, apresentam maior atividade de POD em relação ao biótipo S, pela aplicação do fomesafen.

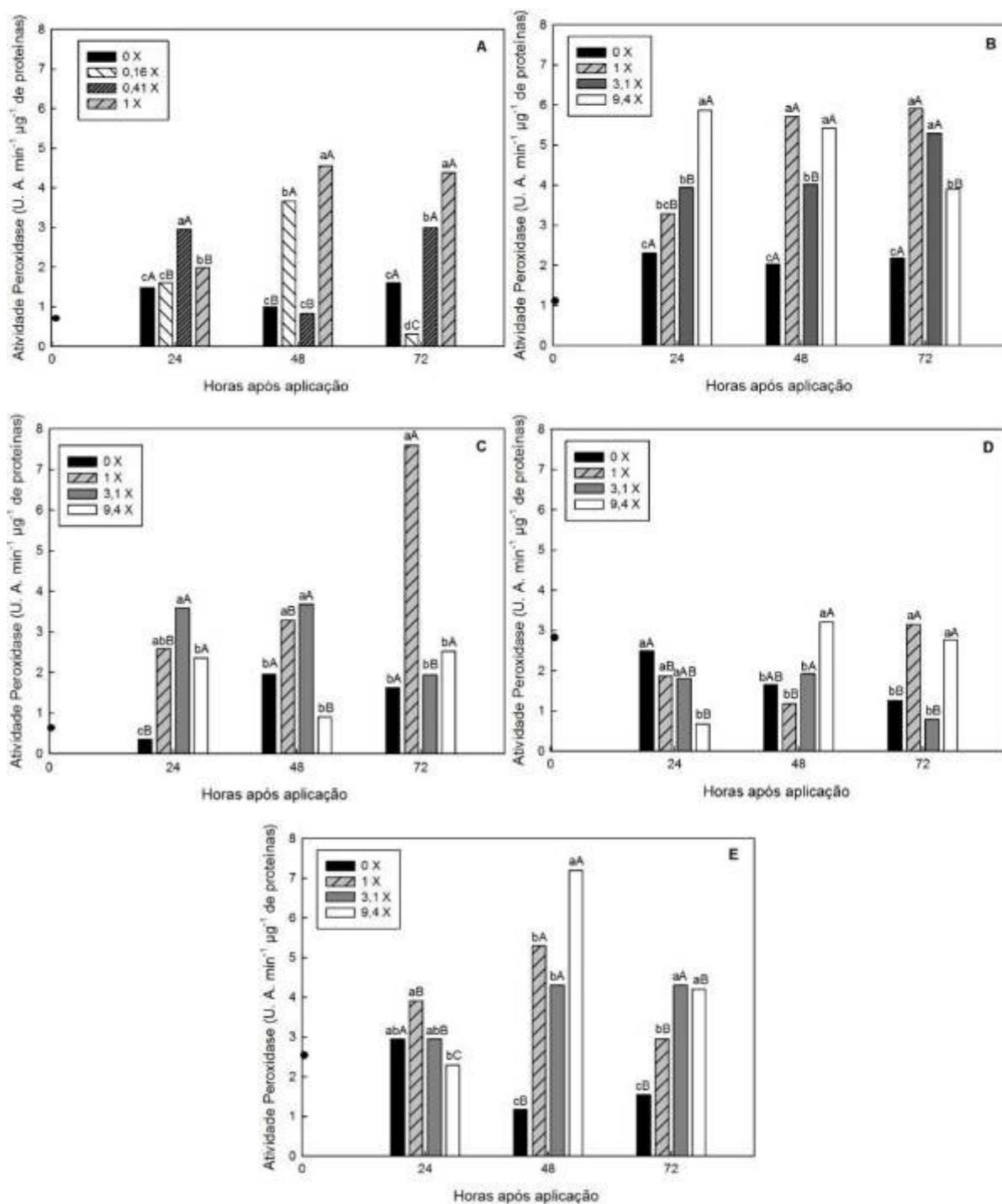


Figura 5.10 - Atividade da enzima POD (UA min<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteínas), 24, 48 e 72 HAA de fomesafen. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De forma resumida, a ordem decrescente de indução da atividade da POD no biótipo S em função dos herbicidas testados, sem considerar a dose e o tempo de resposta, foi a seguinte, em ordem decrescente: oxadiazon > flumiclorac > fomesafen > saflufenacil > carfentrazone.

Analisando o biótipo Medianeira, a seguinte ordem pode ser proposta: fomesafen > oxadiazon > flumiclorac > saflufenacil > carfentrazone. Para o Vilhena a ordem de indução da atividade da POD seria a seguinte: fomesafen > oxadiazon > saflufenacil > flumiclorac > carfentrazone. Para o biótipo Vitorino, a atividade da POD tem a seguinte sequência de capacidade indutiva: oxadiazon > flumiclorac > saflufenacil > fomesafen > carfentrazone. E finalmente, para o Bom Sucesso do Sul, a ordem seria o seguinte: saflufenacil > flumiclorac > carfentrazone > oxadiazon > fomesafen.

Os biótipos estudados apresentaram respostas variadas da atividade da POD pela aplicação das doses dos herbicidas testados. Se classificar estes biótipos segundo os valores das atividades obtidas, considerando a média dos cinco herbicidas testados, a classificação seria a seguinte: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > S > Vilhena. Os biótipos Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vitorino apresentaram uma relação entre a alta atividade da POD e baixos níveis de controle obtidos para estes herbicidas (Capítulo 02). No entanto, o Vilhena, apresentou atividade média da POD inferior ao biótipo S, mesmo comportamento constatado em relação à enzima SOD, em discussão anterior. Isto demonstra que o biótipo Vilhena apresenta um sistema de defesa antioxidante pouco eficiente se forem considerados apenas os resultados apresentados neste trabalho. Porém com base no verificado nos ensaios de controle, não foram visualizados grandes danos. Isto pode indicar que os momentos avaliados podem não ser adequados para este biótipo ou há outros mecanismos envolvidos.

De Tullio; Arrigoni (1992) sugerem que a maior atividade da POD nos biótipos R, pela eliminação do  $H_2O_2$  poderia desempenhar um papel importante no desenvolvimento de mecanismos de defesa contra agentes de estresse. Já Souza et al. (2003), sugere que a atividade da POD antes da ação estressante, e o aumento da atividade da enzima, pode estar relacionado com um mecanismo de defesa. No entanto estas constatações podem ser relevantes para uma condição de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX, fato apresentado nos biótipos R Medianeira, Vitorino e Bom Sucesso do Sul, que têm atividade inicial (antes da aplicação dos herbicidas), superior ao biótipo S (Figuras 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10).

Em estudos sobre a atividade das PODs em relação à resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas, concluiu que as POD são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos



radicais se polimerizam para formar a lignina. Esse polímero, juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração do patógeno (VIECELLI et al., 2010). Esta barreira física para patógenos, gerada pela condição de estresse pode ser um modo de defesa que as plantas utilizam no momento da aplicação dos herbicidas, o que de certa forma, seria uma barreira para que estas moléculas pudessem atingir possíveis receptores nas membranas celulares responsáveis pela iniciação de um processo de sinalização.

Levando-se em consideração apenas a indução da atividade da POD, verifica-se que dentro dos dois grupos – S e R – as respostas são bastante variadas em função das moléculas químicas utilizadas e as respectivas doses, sendo que isoladamente, não se pode caracterizar um biótipo como R ou S considerando-se apenas a atividade da POD. A POD, muitas vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado, se biótico ou abiótico (SIEGEL, 1993; LIMA et al., 1999), como estresse salino (MITTAL; DUBEY, 1991; SAHU; MISHRA, 1987; LIMA et al., 1999; ROSSI et al., 1997), estresse hídrico (JADOSKI et al., 2005), em condição de exposição de metais pesados (GASPAR et al., 1985; MARKKOLA et al., 1990; ROSSI; LIMA, 2001) e também por ataque de patógenos (MOHAN; KOLATTUKUDY, 1990; ARAÚJO et al., 2008). A POD funciona como uma espécie de termômetro geral das atividades fisiológicas da planta, pois suas atividades são altamente influenciadas pelas condições externas da planta (MENEZES et al., 2004).

A literatura documenta que esta enzima também pode ser utilizada como indicador de estresse oxidativo em condição de aplicação de herbicidas. Wang; Zhou (2006) verificaram alterações na atividade da POD em trigo, em estresse pela aplicação do herbicida chlorimuron-ethyl, assim como observado por Savic et al. (2010) com o uso de fosfinotricina em *Lotus corniculatus*. Jiang; Yang (2009) observaram que o estresse oxidativo induzido pelo herbicida prometrina provocou alterações significativas na atividade da POD, a qual aumentou em baixas concentrações do herbicida.

Como característica geral da atividade da POD pela aplicação dos inibidores da PROTOX nos biótipos estudados, observou-se que houve picos de atividade, consideradas para os períodos avaliados como atividade máxima da POD. As doses apresentaram diferentes comportamentos, com o decorrer do tempo após

a aplicação dos herbicidas. Houve condição que a atividade da POD reduziu com o decorrer do tempo. Esta condição ocorreu, em geral, com as maiores doses testadas, com a atividade máxima da POD ocorrendo poucas horas após aplicação dos herbicidas, e a posterior redução da atividade, é condizente com estes mecanismos antioxidantes, que por serem os primeiros a serem ativados, tendem a diminuir sua ação a disparo de outros processos metabólicos de defesa, chegando à resistência.

A atividade superior da POD no biótipo S, comparado ao biótipo Vilhena pode estar relacionada à capacidade da planta em responder prontamente ao estresse, porém, não ser capaz de ativar e/ou manter o sistema de defesa de forma a evitar o colapso. O processo é tao intenso que outros mecanismos não são ativados ou são insuficientes que as células não resistem. No caso da POD, a qual está presente em todas as plantas e tem função antioxidante, a ativação pode indicar sua capacidade de evitar acúmulo inicial de  $H_2O_2$ , porém, não se sabe se outras funções não foram ativadas neste processo, como lignificação e suberização (ALMAGRO et al., 2009; SINGH et al., 2013). Com isso, há a necessidade de realizar trabalhos futuros para explorar mais profundamente esta enzima, a fim de desvendar quais funções da POD estão sendo ativadas quando da aplicação do herbicida, de modo, melhor entender o sistema de defesa dos biótipos R e S.

### 5.5.3 Catalase (CAT)

A atividade da CAT pela aplicação dos herbicidas inibidores da PROTOX, nos biótipos estudados é apresentada nas figuras 5.11, 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15.

O herbicida saflufenacil, em geral, teve uma ação mais lenta sobre os biótipos R, sendo que em 24 HAA, a maior atividade foi observada para S, com a aplicação da dose 1x ( $673 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$ ) (Figura 5.11 A), porém, sem diferença significativa entre esta e a testemunha (sem herbicida). Nos biótipos R, as respostas de indução foram ativadas com 48 HAA, mas as doses foram diferenciadas para cada um dos biótipos. Enquanto para o Medianeira, Vilhena e Bom Sucesso do Sul a dose de 1x foi a que apresentou os maiores valores ( $805 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$ ,  $538 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$  e  $403 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$ ), respectivamente (Figuras 5.11 B, C e E), para Vitorino o efeito indutor

só foi observado com a dose de 3,1x ( $646 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ) (Figura 5.11 D). A atividade máxima do sistema foi obtido com o Medianeira na dose 1x 48 HAA, de  $805 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ .

Após 48 HAA, Medianeira e Vilhena não foram capazes de manter a atividade da CAT elevada, em qualquer dose aplicada (Figuras 5.11 B e C), apesar de que isto ocorreu com Vitorino também. Mas, variando com a dose utilizada (Figura 5.11D). Já o Bom Sucesso do Sul manteve a atividade da CAT constante, não diferindo entre os períodos (Figura 5.11 E).

Para o herbicida saflufenacil, os biótipos podem ser classificados, em ordem decrescente de valores médios da CAT, como: S > Medianeira > Vitorino > Vilhena > Bom Sucesso do Sul. Isto demonstra que o biótipo S, apresenta maior atividade de CAT em relação aos biótipos R, pela aplicação do saflufenacil.

O herbicida oxadiazon também foi capaz de induzir aumento na atividade enzimática a partir das 24 HAA, sendo que o biótipo Vilhena foi o que melhor respondeu neste tempo, nas doses de 1x e 3,1x (Figura 5.12 C). Já para os demais biótipos R e S, as maiores atividades foram atingidas 48 HAA, em doses diferenciadas, com o Vitorino mantendo atividade da CAT mesmo 72 HAA (9,4 x) (Figura 5.12 D).

Em valores, a maior atividade da CAT ocorreu com o biótipo Vilhena ( $1778 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ), na dose 3,1x 24 HAA (Figura 5.12 C), seguido pelo biótipo S ( $1588 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ), na dose 1x 48 HAA (Figura 5.12 A). Comparando os biótipos pela dose 1x, observou-se que para o Vilhena a máxima atividade foi obtida 24 HAA ( $1732 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ), para o S, Medianeira e Bom Sucesso do Sul, as máximas atividades para esta dose foram obtidas 48 HAA, sendo estas de 1588, 505 e 609  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ , respectivamente, sendo a atividade do biótipo S obtido muito superior às demais. O biótipo Vitorino apresentou máxima atividade nesta dose as 72 HAA, de 509  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ . Isto demonstra as diferentes respostas desta enzima nos biótipos testados para a mesma dose.

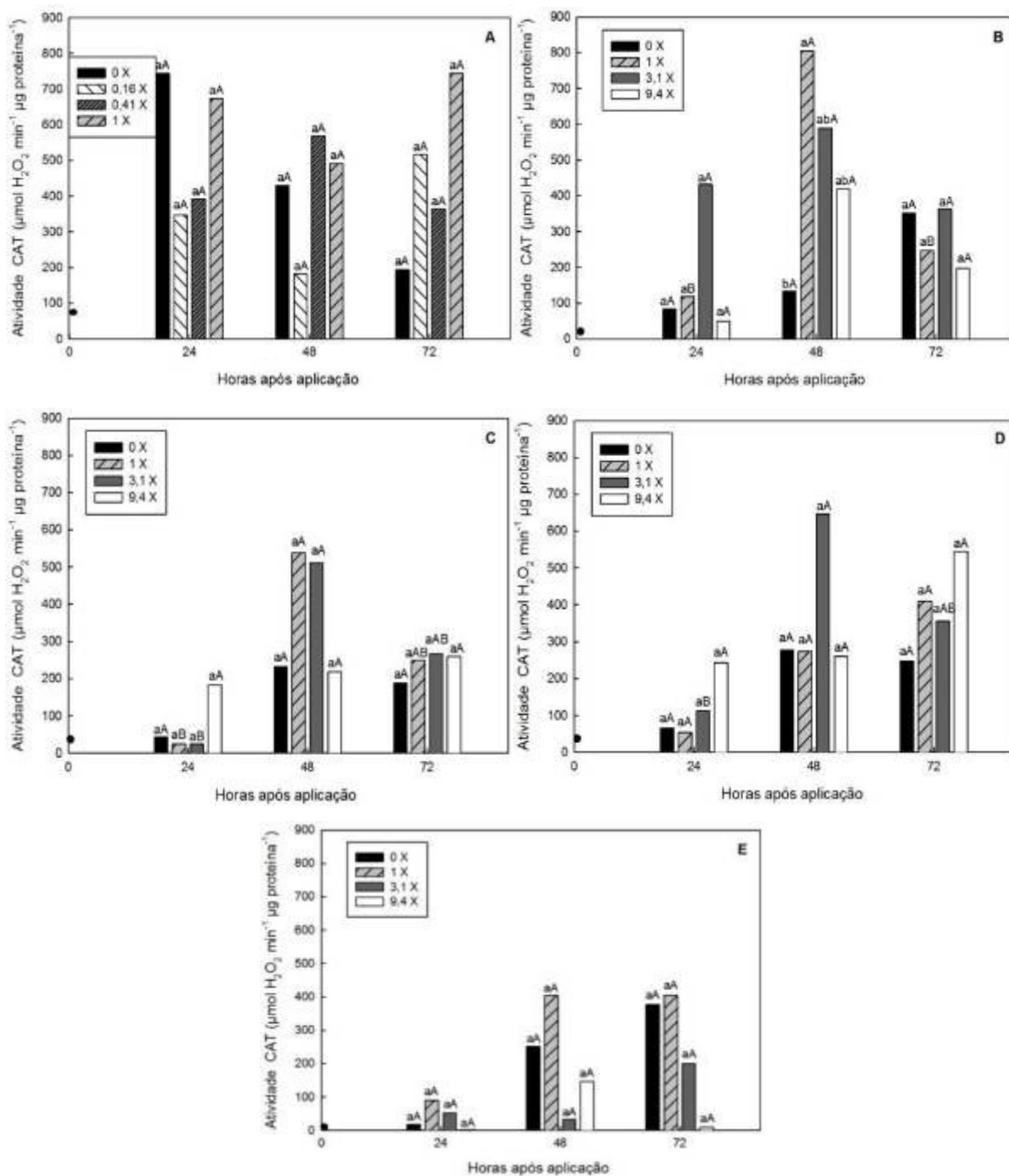


Figura 5.11 - Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o herbicida oxadiazon, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da CAT, considerando todas as doses e períodos, em ordem decrescente como: S > Vilhena > Vitorino > Bom Sucesso do Sul > Medianeira. Novamente o biótipo S apresenta atividade da CAT superior aos biótipos R.

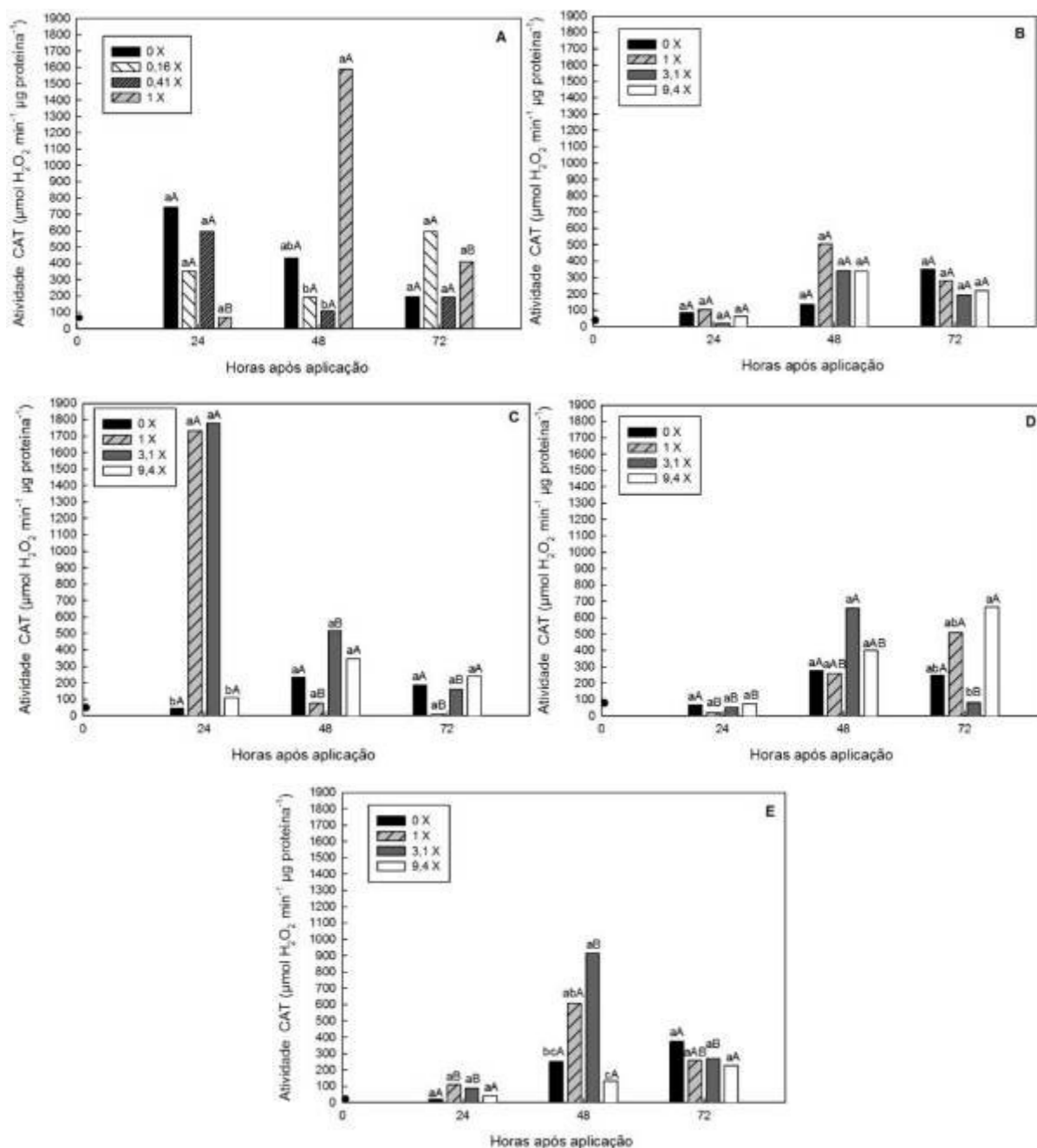


Figura 5.12 - Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de oxadiazon. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Da mesma forma que no presente experimento, a elevada atividade da CAT no biótipo S não foi capaz de tamponar o aumento da formação de EROs (PARADEDA et al., 2011) o que é evidenciado pelo alto controle deste biótipo quando exposto ao oxadiazon (Capítulo 02).

Em comparação com o herbicida anterior (oxadiazon), o carfentrazone não foi um indutor da atividade da CAT tão eficiente (Figura 5.13). A melhor resposta

foi verificada no biótipo S, 48 HAA ( $695 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ), porém, sem diferença da testemunha sem aplicação de herbicida (Figura 5.13 A). Isto parece indicar que o sistema que envolve a quebra do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por esta enzima é mais efetivo no biótipo S, sendo uma característica intrínseca do mesmo.

No caso dos biótipos R, o maior valor obtido da atividade enzimática foi na dose 9,4x no biótipo Bom Sucesso do Sul, 72 HAA ( $696 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ) (Figura 5.13 E), com os demais sendo ativados, mas ficando abaixo dos valores de S. Indicando pouca efetividade ou menor capacidade deste herbicida em ativar a via envolvendo a CAT, diferentemente da POD. Para o herbicida carfentrazone, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da CAT, em ordem decrescente como: S > Vitorino > Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vilhena.

Resultados muito parecidos foram obtidos com tratamento pelo flumiclorac, em relação aos valores relativamente baixos, com exceção para o biótipo Bom Sucesso do Sul, o qual teve a atividade de CAT superativada em 48 HAA, nas doses 3,1x e 9,4x ( $3098 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$  e  $2781 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 5.14 E). Entre os demais biótipos R, o Medianeira foi o que melhor respondeu com aumento de atividade da CAT, em 48 HAA, na dose de 1x ( $680 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ) (Figura 5.14 B), seguido por Vitorino no mesmo período e dose (Figura 5.14 D). O Vilhena (Figura 5.14 C) apresentou valores muito abaixo dos apresentados pelo S.

Novamente, o biótipo S respondeu melhor na ativação enzimática, no menor período do tratamento (24 HAA), com a dose de 1x (Figura 5.14 A), com alguns valores sendo mantidos em outras doses e tempos.

Resultados muito parecidos foram obtidos com tratamento pelo flumiclorac, em relação aos valores relativamente baixos, com exceção para o biótipo Bom Sucesso do Sul, o qual teve a atividade de CAT superativada em 48 HAA, nas doses 3,1x e 9,4x ( $3098 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$  e  $2781 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 5.14 E). Entre os demais biótipos R, o Medianeira foi o que melhor respondeu com aumento de atividade da CAT, em 48 HAA, na dose de 1x ( $680 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g proteína}^{-1}$ ) (Figura 5.14 B), seguido por Vitorino no mesmo período e dose (Figura 5.14 D). O Vilhena (Figura 5.14 C) apresentou valores muito abaixo dos apresentados pelo S.

Novamente, o biótipo S respondeu melhor na ativação enzimática, no

menor período do tratamento (24 HAA), com a dose de 1x (Figura 5.14 A), com alguns valores sendo mantidos em outras doses e tempos.

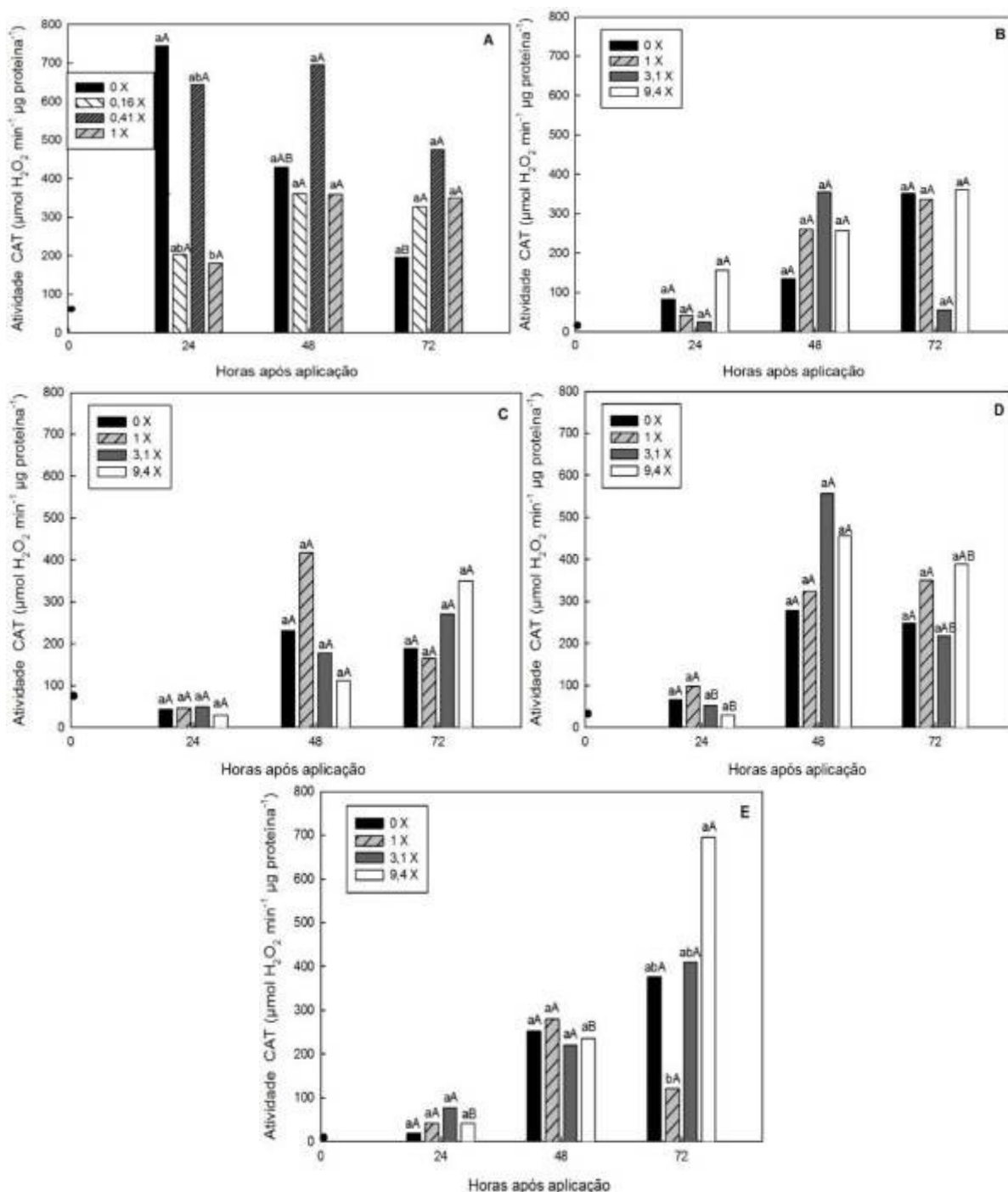


Figura 5.13 - Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de carfentrazone. (A) Suscet\u00edvel, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. M\u00e9dias seguidas de mesma letra min\u00fascula (dose dentro de per\u00edodo) e mai\u00fascula (per\u00edodo dentro de dose) n\u00e3o diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o flumiclorac, os bi\u00f3tipos S e R podem ser classificados, levando-se em considera\u00e7\u00e3o os valores m\u00e9dios da CAT, em ordem decrescente como: Bom

Sucesso do Sul > S > Vitorino > Vilhena > Medianeira. Diferentemente das atividades obtidas com o saflufenacil, oxadiazon e carfentrazone, o Bom Sucesso do Sul apresentou valores da CAT superiores, isto mostra que o flumiclorac, ativa muito mais a CAT do Bom Sucesso do Sul que os outros herbicidas.

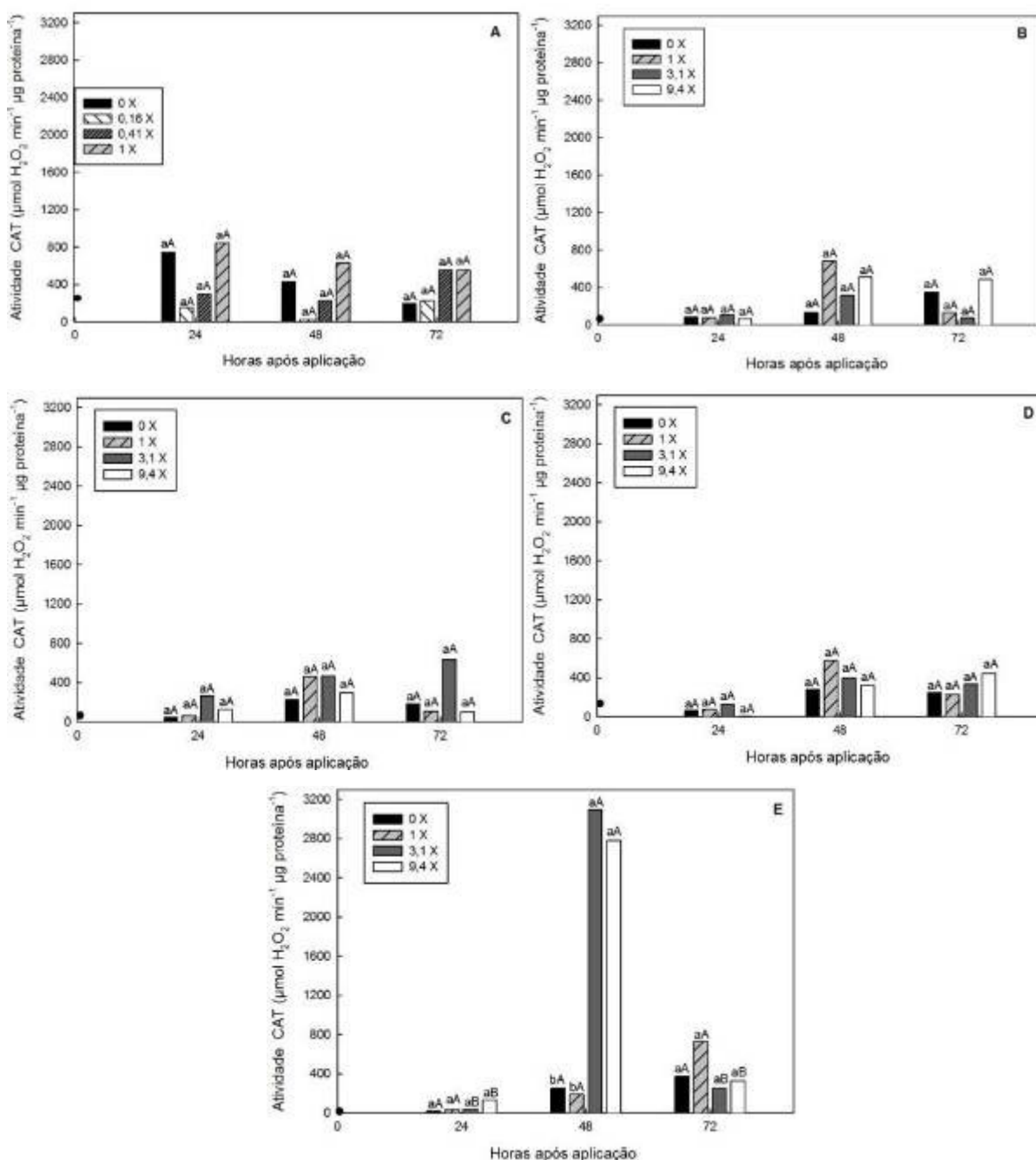


Figura 5.14 - Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de flumiclorac. (A) Suscet\u00edvel, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. M\u00e9dias seguidas de mesma letra min\u00fascula (dose dentro de per\u00edodo) e mai\u00fascula (per\u00edodo dentro de dose) n\u00e3o diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com a aplica\u00e7\u00e3o de fomesafen, verificou-se que o bi\u00f3tipo S apresentou alta atividade j\u00e1 em momento iniciais (24 HAA) (Figura 5.15 A), enquanto os bi\u00f3tipos



R somente 48 HAA (Figura 5.15 B, C, D e E). A maior atividade do sistema foi obtida pelo Vilhena, 48 HAA, na dose de 9,4x ( $1001 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ) seguido do bi\`otipo S, no mesmo per\`iodo, mas na dose de 0,16x ( $818 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\mu\text{g prote\acute{a}na}^{-1}$ ) (Figuras 5.15 C e A, respectivamente), apesar de n\`ao haver diferen\`ca significativa para este \`ultimo e a testemunha, novamente indicando a alta capacidade deste bi\`otipo na via antioxidativa que envolve a CAT.

Os demais bi\`otipos apresentaram respostas variadas, conforme dose e per\`iodo de tempo, mas foram necess\`arias maiores concentra\`oes das mol\`eculas herbicidas para estas ativa\`oes (Figura 5.15 B, D e E). Para o fomesafen os bi\`otipos S e R podem ser classificados, levando-se em considera\`ao os valores m\`edios da CAT, em ordem decrescente como: S > Vilhena > Bom Sucesso do Sul > Vitorino > Medianeira.

Os resultados obtidos para CAT demonstraram que esta via parece ser pouco influenciada nos bi\`otipos R pelos tratamentos com os herbicidas testados, j\`a que a maioria, o bi\`otipo S apresentou valores superiores aos primeiros, indicando que o processo antioxidativo, via catalase, parece ser muito ativo para o bi\`otipo S.

Os bi\`otipos estudados tamb\`em apresentaram respostas variadas da atividades da CAT em fun\`ao das doses testadas. A classifica\`ao dos bi\`otipos segundo os valores das atividades da CAT para os cinco herbicidas testados \`e a seguinte: S > Bom Sucesso do Sul > Vilhena > Vitorino > Medianeira.

Comparando a atividade da CAT pelos herbicidas testados, para o bi\`otipo S, segue a seguinte ordem: oxadiazon > flumiclorac > fomesafen > carfentrazone > saflufenacil. Para o bi\`otipo Medianeira, a ordem foi o seguinte: saflufenacil > flumiclorac > oxadiazon > carfentrazone > fomesafen.

Para o bi\`otipo Vilhena a ordem decrescente da atividade da CAT foi a seguinte: oxadiazon > fomesafen > flumiclorac > saflufenacil > carfentrazone. Com o Vitorino, a atividade da CAT pelos herbicidas foi o seguinte: saflufenacil > oxadiazon > flumiclorac > carfentrazone > fomesafen. E para o Bom Sucesso do Sul, a ordem foi a seguinte: flumiclorac > oxadiazon > fomesafen > carfentrazone > saflufenacil. Isto demonstra que a resposta da CAT de cada bi\`otipo varia em fun\`ao do herbicida aplicado.

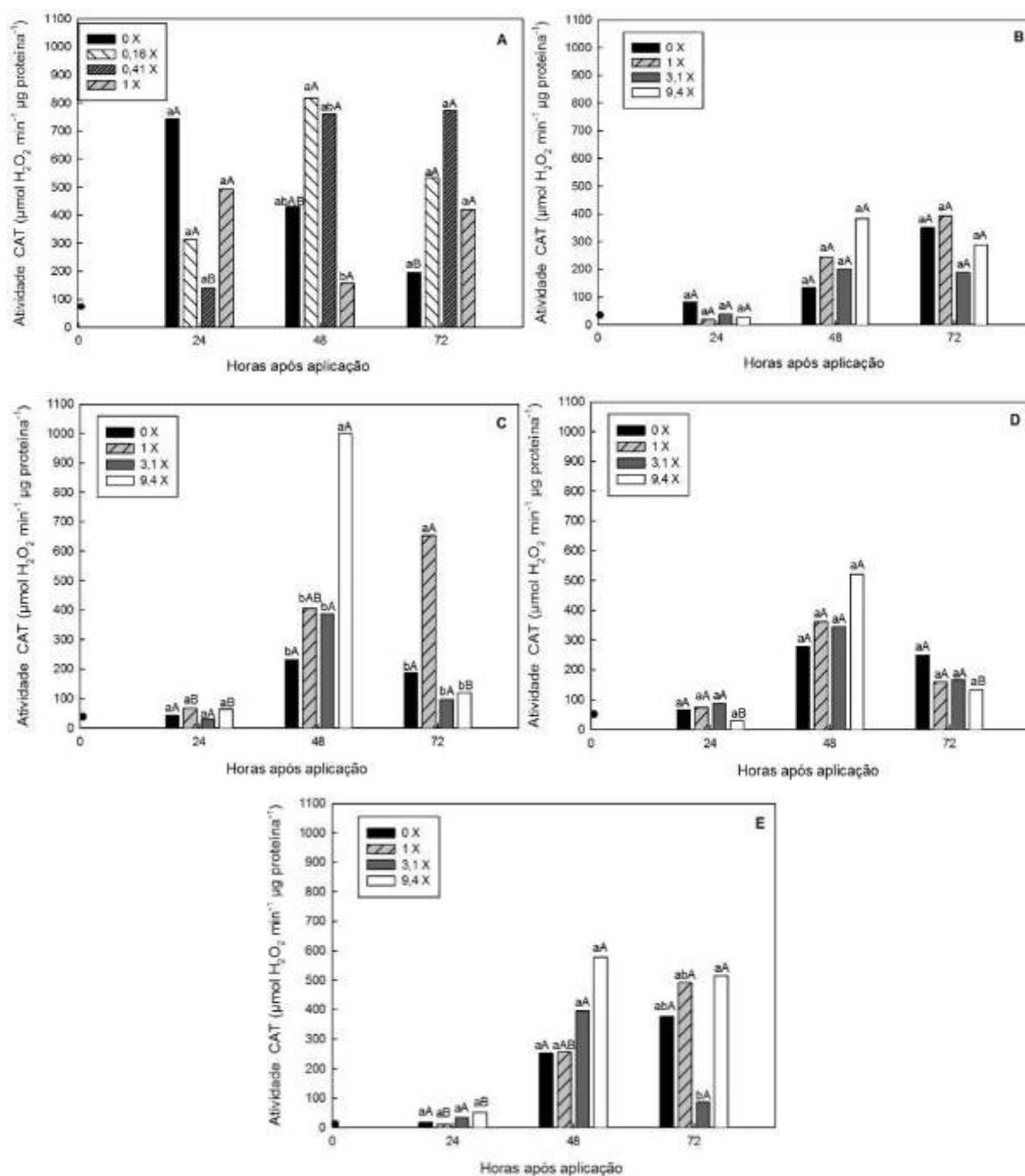


Figura 5.15 - Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ ), 24, 48 e 72 HAA de fomesafen. (A) Suscet\u00edvel, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul. M\u00e9dias seguidas de mesma letra min\u00fascula (dose dentro de per\u00edodo) e mai\u00fascula (per\u00edodo dentro de dose) n\u00e3o diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos das enzimas antioxidantes com outros herbicidas inibidores da PROTOX s\u00e3o encontrados na literatura. Kenyon; Duke (1985) com aplica\u00e7\u00e3o do herbicida acifluorfen, observaram que este provocou a destrui\u00e7\u00e3o fotooxidativa irrevers\u00edvel de tecido de *Cucumis sativus* L., em parte, pela diminui\u00e7\u00e3o da atividade das enzimas de prote\u00e7\u00e3o, como SOD, CAT, POD, quando da aplica\u00e7\u00e3o do herbicida

e da presença de luz. Singh et al. (2010) verificaram que a exposição de *Ocimum gratissimum* ao herbicida oxyfluorfen (inibidor da PROTOX) estimulou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e a CAT.

Ativação de enzimas antioxidantes pela aplicação de herbicidas de outros mecanismos de ação, também são descritos na literatura. Com aplicação de 2,4-D em ervilha, constatou-se que mesmo na menor concentração de 2,4-D ocorreu aumento da atividade da POD e SOD, enquanto a atividade da CAT foi fortemente inibida (IVANOV et al., 2002). A queda na atividade de enzimas antioxidantes como a POD, SOD e CAT, pode ter contribuído para impedir a inibição das EROs geradas pela aplicação dos herbicidas (SOUZA, 2009).

O estudo do mecanismo bioquímico, como a atividade das enzimas antioxidantes pelo efeito herbicida em plantas daninhas é de grande importância para o conhecimento do modo de ação deste herbicida, e também do estudo dos mecanismos de resistência aos mesmos. Este trabalho permitiu verificar em biótipo de EPHHL R e S aos inibidores da PROTOX a resposta das enzimas antioxidantes CAT, POD e SOD em resposta a diferentes doses de cinco grupos químicos dos herbicidas inibidores da PROTOX, mostrando os efeitos sobre as atividades que apresentam pela aplicação destes herbicidas.

Cada biótipo apresentou comportamento diferenciado para as enzimas SOD, POD e CAT. Os biótipos Bom Sucesso do Sul e Medianeira se destacaram pelas elevadas atividades da POD e SOD, no entanto, apresentaram menores atividades de CAT. O biótipo S apresentou atividade superior da SOD em comparação aos biótipos Vitorino e Vilhena, da POD em relação ao Vilhena e da CAT atividade superior que todos os biótipos R. Isto demonstra que cada biótipo possui enzimas que responderem com maior ou menor atividade em resposta aos herbicidas, isto vai depender das rotas bioquímicas ativadas durante o processo de estresse oxidativo.

E que, a via antioxidante é ativa constitutivamente e pode ser incrementada no caso dos biótipos R, conferindo certa proteção contra danos provocados pela aplicação desses compostos, sugerindo que se não for uma parte integrante da resistência específica, é uma via que pode ser considerada como sinalizadora no mecanismo de defesa destes biótipos.

## 5.6 CONCLUSÕES

As enzimas peroxidase, superóxido dismutase e catalase dos biótipos Suscetível, Medianeira, Vitorino, Vilhena e Bom Sucesso do Sul apresentaram aumentos na atividade pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX saflufenacil, carfentrazone, flumiclorac, fomesafen e oxadiazon,

Para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vitorino, pode-se afirmar que a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e peroxidase pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência aos inibidores da PROTOX. A enzima catalase parece ser um mecanismo complementar envolvido nesta resistência, visto que para esta enzima o Suscetível obteve maior atividade desta enzima que os quatro biótipos resistentes.

Para o biótipo Vilhena a atividade enzimática das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e catalase, provavelmente, e não são os mecanismos envolvidos na resistência, já que estas enzimas apresentaram atividade inferior às do biótipo Suscetível.

## 6. CAPÍTULO V – MONITORAMENTO DE BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L. COM RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA ALS EM ÁREAS ANTERIORMENTE DIAGNOSTICADAS NO OESTE E SUDOESTE DO PARANÁ

### 6.1 RESUMO

*Euphorbia heterophylla* conhecida como leiteiro, é uma importante planta daninha que interferem no rendimento das culturas. Com a existência de casos de resistência aos inibidores da ALS nas regiões Oeste e Sudoeste (PR), em levantamentos prévios, teve-se necessidade de monitoramento estas áreas. Assim, este trabalho teve como objetivos: a) identificar a persistência de populações resistentes aos inibidores da ALS e da PROTOX de *E. heterophylla* em lavouras da região Sudoeste e Oeste do Paraná que apresentavam resistência em levantamentos prévios; b) verificar, também, o controle destas populações de *E. heterophylla* pelo glifosato. Sementes de biótipos de *E. heterophylla* foram coletadas em 18 propriedades, em 6 municípios do Paraná, em áreas onde havia resistência aos herbicidas inibidores da ALS, confirmada em levantamentos prévios. No momento da coleta das sementes, entrevistaram-se os produtores através de um questionário, quanto ao manejo das plantas daninhas, sistema de preparo do solo, rotação de culturas e colheita. Os resultados obtidos demonstram que todos os biótipos de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX permanecem nas áreas mesmo após longo período de constatação da resistência, no entanto, estes últimos em menor frequência que a resistência aos inibidores da ALS. O glifosato apresenta-se como eficiente método de controle destas populações resistentes. O manejo de plantas daninhas adotado na maioria das propriedades em que foi efetuado o levantamento pode ser considerado inadequado, necessitando mudanças, para a manutenção da eficácia dos herbicidas e para que não se percam as cultivares geneticamente modificadas resistentes aos herbicidas.

### 6.2 ABSTRACT

*Euphorbia heterophylla* (EPHHL or wild poinsettia) is an important weed that interferes with the crop yield. Previous surveys detected the occurrence of

resistance to ALS-inhibiting herbicides in the West and Southwest regions of the Paraná state, which urged the need to monitor these areas. The objectives of this study were: (1) to identify the persistence of EPHHL populations resistant to ALS and to PROTOX inhibitors on crops from the Southwest and Western Paraná that were resistant on the previous survey; (2) to evaluate the efficacy glyphosate on these populations of *E. heterophylla*. Seeds of plants from several *E. heterophylla* biotypes were collected in 18 properties in 6 cities of Paraná state, in areas where there was resistance to ALS inhibitors, confirmed in a previous study. At the time of the seed harvest, farmers were interviewed using a questionnaire which evaluated the weed management system, the type of tillage, the crop rotation, and type crop harvesting equipment. The results showed that all areas with biotypes of *E. heterophylla* resistant to ALS and to PROTOX inhibitors maintain herbicide resistant plants, even after long-term observation of resistance. But, plants resistant to PROTOX inhibitors are less frequent than the resistant to ALS inhibitors. Glyphosate appears to be an efficient method to control these resistant populations. The weed management adopted in most of the properties in which the study was conducted may be considered inappropriate, necessitating changes to maintain the effectiveness of herbicides and not to lose genetically modified herbicide-resistant cultivars.

### 6.3 INTRODUÇÃO

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um fenômeno evolutivo e com grande importância mundial nos últimos anos (KAJINO et al., 2010). Devido ao uso incorreto de herbicidas, tem havido alterações na composição da flora daninha presente em lavouras, com incremento de espécies tolerantes e o surgimento de novos casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas a cada ano (BIANCHI, 2007; HEAP, 2014). A falta de lançamento de novos herbicidas no mercado, associada ao rápido aumento dos casos de resistência em plantas daninhas acaba ameaçando a produção agrícola mundial e a segurança alimentar da população (HEAP, 2013).

O levantamento dos casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas é de grande importância, pois permite identificar características de manejo comuns nas propriedades que estejam ocasionando a expressão da resistência ou apressando o processo de seleção de biótipo resistente (R), ajudando

na determinação da gravidade do problema, além de permitir verificar se a resistência se desenvolveu isoladamente ou foi disseminada de algumas regiões para outras (ANDRES et al., 2007).

No mundo, existem vários estudos de levantamento de resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Os resultados de muitos desses levantamentos são registrados no site “International Survey of Herbicide Resistant Weeds”, onde atualmente constam 221 espécies daninhas que desenvolveram resistência a 152 herbicidas diferentes (HEAP, 2014). A coleta de informações efetuadas durante o levantamento permite testar hipóteses que possibilitam identificar o grau de probabilidade de ocorrência de resistência, em função dos sistemas de manejo empregados na propriedade agrícola. Por exemplo, com o levantamento de casos de resistência ao glifosato, efetuado por Rosenbaum; Bradley (2013), para a espécie *Amaranthus rudis*, foi possível verificar que sua ocorrência dar-se-á mais provavelmente em áreas sem outras espécies de plantas daninhas presentes no final da safra, áreas com cultivo contínuo da soja e com uso exclusivo de glifosato por várias safras consecutivas.

Levantamento efetuado em 1000 locais no Canadá identificou várias espécies daninhas R a vários mecanismos de ação, apresentando suas frequências de ocorrência, a área total em cada local infestado e ainda identificaram que a causa destas resistências foi devido ao uso contínuo de mesmo mecanismo de ação nestes locais (BECKIE et al., 2013). Em levantamento de 264 campos de cultivo de trigo na Austrália, Llewellyn; Powles (2001), constataram que as populações de *Lolium rigidum* R aos inibidores da ACCase e da ALS são mais comuns do que as populações suscetíveis (S) desta espécie em grande parte dos campos de trigo da Austrália Ocidental.

No Brasil, estudos de levantamento de resistência foram realizados para identificar, *Bidens* spp. R aos inibidores da ALS (HERNANDES et al., 2005), para *Echinochloa* sp. R aos inibidores da ACCase (ANDRES et al., 2007) e para *Euphorbia heterophylla* (EPHHL) R aos inibidores da ALS (VIDAL et al., 2004; WINKLER; VIDAL, 2004), EPHHL R aos inibidores da ALS e da PROTOX (TREZZI et al., 2005) e EPHHL R aos inibidores da ALS e da EPSPS (VARGAS et al., 2013).

A EPHHL, popularmente conhecida como leiteiro, leiteira, amendoim-bravo, é uma das principais plantas daninhas da soja, devido sua alta capacidade competitiva por recursos com a cultura, podendo ocasionar redução da qualidade e

produtividade de grãos (CARVALHO et al., 2010).

O levantamento de resistência aos herbicidas nesta espécie já foi realizada no Brasil, sendo esta principalmente em casos de resistência aos inibidores da ALS, ALS/PROTOX e EPSPS (VIDAL et al., 2004; WINKLER; VIDAL, 2004; TREZZI et al., 2005; VIDAL et al., 2007b; VARGAS et al., 2013). Para estes estudos confirmou-se a resistência aos inibidores da ALS e da ALS/PROTOX, demonstrando que os biótipos R aos herbicidas inibidores da ALS estão amplamente distribuídos na região amostrada. Também se constatou que o principal fator responsável pela seleção de plantas R na espécie EPHHL foi a elevada utilização dos herbicidas nos anos anteriores a coleta. Até o momento, o levantamento efetuado no Rio Grande do Sul não constatou a existência de populações de EPHHL R ao glifosato neste estado (VARGAS et al., 2013), embora haja indícios de populações que não são controladas com doses baixas de glifosato (VIDAL et al., 2007b).

Em propriedades com histórico de resistência há a necessidade do seu monitoramento, com avaliação da dinâmica do banco de sementes R e S. Esta dinâmica é influenciada pelo balanço de entradas e saídas de sementes na lavoura, que controla, por sua vez, a densidade, composição florística e reserva genética das espécies em uma comunidade (ALMEIDA-CORTEZ, 2004). A troca de sementes entre lavouras é um dos principais meios de entrada e saída de resistência destas áreas. Características biológicas dos propágulos e as práticas de manejo adotadas a partir da introdução dos mesmos determinarão ou não a evolução das populações R e sua permanência nas áreas.

A resistência de EPHHL aos inibidores da ALS já foi um sério problema nas lavouras da região Sul do Brasil (VIDAL et al., 2004; WINKLER; VIDAL, 2004; TREZZI et al., 2005), principalmente no período anterior a implantação da soja RR. Contudo, a necessidade de identificar a situação atual em áreas anteriormente diagnosticadas se deve ao fato de estarem previstos lançamentos de cultivares geneticamente modificadas R aos inibidores da ALS no mercado brasileiro. A plena viabilidade dessa tecnologia depende da existência ou não de população ativa e passiva de EPHHL R aos inibidores de ALS nestas lavouras, visto que se confirmada a resistência a estes herbicidas, haveria comprometimento da eficiência de controle nas lavouras.

Assim, este trabalho teve por objetivo: identificar a persistência de



populações resistentes aos inibidores da ALS e da PROTOX de *E. heterophylla* em lavouras da região Sudoeste e Oeste do Paraná que haviam sido previamente diagnosticadas com resistência; verificar o controle exercido pelo glifosato nestas populações.

## 6.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.4.1 Coleta de Sementes e Aplicação de Questionário

As sementes de EPHHL foram coletadas entre os meses de fevereiro e março de 2012, de plantas provenientes de lavouras das regiões Oeste e Sudoeste do Paraná. Essas áreas de lavoura apresentavam, há anos atrás, resistência aos herbicidas inibidores da ALS. Foram coletadas sementes viáveis de plantas maduras, em pontos aleatórios nas propriedades, tendo as áreas sido georeferenciadas. A área de estudo (1.263,6 hectares) envolve propriedades localizadas nos municípios de Medianeira, Pato Branco, Vitorino, Coronel Vivida, Itapejara D'Oeste, Bom Sucesso do Sul, no estado do Paraná (Figura 6.1; Apêndice 0). A coleta ocorreu em 18 propriedades.



Figura 6.1 - Mapa do Estado do Paraná, com a localização geográfica dos municípios amostrados em cinza. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Após a coleta, as sementes foram catalogadas, acondicionadas em

envelopes de papel e armazenadas em câmara com temperatura controlada a 4 °C e umidade do ar controlada. No momento da coleta das sementes, os produtores responderam a um questionário (Apêndice P).

#### 6.4.2 Verificação da Resistência

Foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato organomineral 60 sementes por biótipo, para cada um dos três herbicidas testados, dessa forma totalizando 3 bandejas contendo 60 plântulas para cada biótipo. Além das 18 populações amostradas em áreas com histórico de resistência, também foi semeado um biótipo de EPHHL S aos herbicidas inibidores da ALS, da PROTOX e da EPSPS proveniente do banco de germoplasma da UTFPR.

As bandejas foram irrigadas diariamente, e a temperatura média do ar durante a condução do experimento foi de aproximadamente 20 °C. Quando as plântulas estavam no estágio de desenvolvimento de duas folhas verdadeiras, foram aplicados os herbicidas imazethapyr (inibidor da ALS) na dose de 100 g i.a. ha<sup>-1</sup>, fomesafen (inibidor da PROTOX), na dose de 250 g i.a. ha<sup>-1</sup> e glifosato (inibidor da EPSPS) na dose 1050 g e.a. ha<sup>-1</sup>, utilizando pulverizador a pressão constante de CO<sub>2</sub>, com bicos leque 110.02 e volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. Os herbicidas foram aplicados sobre populações distintas, não havendo aplicação de herbicidas distintos sobre a mesma planta. A aplicação foi realizada no dia 23 agosto de 2013 e, no momento da aplicação, a temperatura do ar era de 18,5 °C, com umidade relativa do ar de 78%.

As avaliações de controle foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos herbicidas, utilizando-se uma escala, em que 0% representou ausência de sintomas e 100% a morte das plantas (FRANS et al., 1986). Os biótipos que sobreviveram aos tratamentos foram considerados R. Os dados foram tabulados e foram calculadas as frequências de controle de *E. heterophylla* de cada população após a aplicação dos herbicidas.

### 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados indicam que a resistência aos inibidores da ALS se manteve em 100% das populações amostradas de *E. heterophylla*, em áreas onde fora

constatada a resistência em período predominante de 8 até 10 anos atrás (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Avaliação dos 18 biótipos de *Euphorbia heterophylla* coletados na região Oeste e Sudoeste do Paraná, pela aplicação do herbicida inibidor da ALS. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Biótipos	Número de plantas emergidas	Percentual de plantas emergidas (%)	Número de plantas mortas	Percentual de plantas mortas (%)
1	60	100	0	0
2	48	80	0	0
3	52	87	0	0
4	38	63	0	0
5	35	58	0	0
6	54	90	0	0
7	46	77	0	0
8	46	77	0	0
9	60	100	0	0
10	57	95	1	1,8
11	37	62	0	0
12	60	100	0	0
13	46	77	0	0
14	60	100	0	0
15	60	100	0	0
16	26	43	2	8,0
17	33	55	0	0
18	33	55	0	0

Em geral, verificou-se que 89% dos biótipos testados apresentaram 100% de plantas sobreviventes pela aplicação do imazethapyr, com exceção do biótipo 10 (Bom Sucesso do Sul) e o biótipo 16 (Medianeira) que obtiveram 1,8 % e 8,0%, respectivamente, de plantas mortas.

Levantamentos efetuados entre 10 e 15 anos atrás identificaram que a resistência a inibidores da ALS em populações de EPHHL estava disseminada na região Sul do Brasil (VIDAL et al., 2004). Acima de 80% das propriedades agrícolas no Sudoeste e Oeste do Paraná com suspeita de resistência, em que fora efetuada coleta de sementes, apresentavam resistência de EPHHL aos inibidores da ALS (TREZZI et al., 2005).

Em 61% das propriedades, a resistência a inibidores da ALS foi constatada antes de 2004, e nas demais propriedades até o ano de 2007. Nessas áreas com resistência a ALS, as respostas do questionário evidenciam que todos os agricultores cultivam soja RR entre três a dez anos, ou seja, mesmo com o tempo de

cultivo contínuo de soja RR, ainda existem biótipos R aos inibidores de ALS nestas propriedades.

Em 100% das propriedades, no intervalo entre o levantamento pioneiro e o efetuado em 2012, foi empregado o herbicida glifosato em pré-semeadura (dessecação) e em pós-emergência da cultura da soja. Em um percentual significativo de propriedades, não houve utilização de herbicidas alternativos ao glifosato nas aplicações em pré-semeadura. Os herbicidas 2,4-D e chlorimuron foram utilizados em associação ao glifosato em algumas propriedades.

A manutenção das populações R aos inibidores da ALS ao longo do tempo deve-se principalmente ao fato de que o glifosato não apresenta ação residual no solo (AMARANTE Jr.; SANTOS, 2002). A emergência de EPHHL em fluxos e também os escapes comuns nas aplicações de glifosato contribuiram para a manutenção do banco de sementes ao longo do tempo. Além disso, o fato da resistência aos inibidores de ALS em EPHHL ser conferida por um único gene dominante e com herança nuclear (VARGAS et al., 1999) contribui para que essa característica seja transferida para outras plantas de EPHHL existentes no local.

Embora cerca de 11% dos agricultores usem o herbicida chlorimuron em associação ao glifosato em pré-semeadura, este herbicida não é um bom controlador de EPHHL (AARESTRUP et al., 2008) e também é inibidor da ALS, o que contribui para evolução dos problemas de resistência a esse mecanismo nessas áreas.

A permanência das populações de EPHHL R aos inibidores da ALS nessas áreas chama a atenção para um problema grave. Algumas empresas têm intenção de lançar no Brasil cultivares de soja geneticamente modificadas, com gene de resistência aos inibidores da ALS, no entanto, provavelmente a eficiência dos herbicidas inibidores da ALS a serem utilizados será prejudicada, pois trabalhos de pesquisa demonstram que a natureza da resistência nos biótipos de EPHHL é cruzada (VARGAS et al., 2000; TREZZI et al., 2005) e os fatores de resistência são elevados, o que determina que, mesmo a utilização de doses elevadas dos herbicidas não resultará em controle satisfatório dos biótipos R.

A análise do período entre o levantamento pioneiro e o efetuado em 2012 permite constatar que há ausência de rotação de culturas no verão em algumas áreas, porém em muitas delas a cultura da soja é alternada com a do milho. A rotação de culturas permite a utilização de herbicidas com mecanismos de ação

diferentes, métodos alternativos de controle, diminuindo assim os riscos de falhas de controle e de seleção de plantas daninhas R (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003). A manutenção das populações de EPHHL R aos inibidores da ALS também nas áreas com rotação com a cultura do milho indica que os sistemas de manejo desta espécie daninha não tem sido eficientes para reduzir ao longo do tempo as populações ativa e passiva dessa espécie.

O banco de sementes de uma área é influenciado pelas entradas e saídas de sementes. O maquinário empregado na lavoura muitas vezes é uma importante forma de disseminação de sementes na propriedade. Em 72% das áreas amostradas o agricultor possui colhedora própria. Destas, 46% alugam as máquinas para vizinhos. Assim, 55% das propriedades avaliadas apresentam possibilidade de disseminação de sementes de EPHHL através desse mecanismo, devido à colheita para vizinhos ou à contratação de maquinário. Em 83% das propriedades foram constatados casos de resistência em propriedades vizinhas, consistindo em indicador de possível dispersão da resistência através da distribuição de sementes, cujos mecanismos principais, no caso de EPHHL, são a barocoria e a dispersão por máquinas agrícolas, conforme já observado por Hernandez et al. (2005).

Apenas 17% dos biótipos apresentaram resistência aos inibidores da PROTOX (Tabela 6.2), um deles pertencente à propriedade localizada no município de Vitorino (PR) (biótipo 1) e outros dois a uma propriedade pertencente ao município de Medianeira (PR) (biótipos 17 e 18) (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Avaliação dos 18 biótipos de *Euphorbia heterophylla* coletados na região Oeste e Sudoeste do Paraná, pela aplicação do herbicida inibidor da PROTOX. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Biótipos	Número de plantas emergidas	Percentual de plantas emergidas (%)	Número de plantas mortas	Percentual de plantas mortas (%)
1	60	100	57	95
2	52	87	52	100
3	43	72	43	100
4	30	50	30	100
5	40	67	40	100
6	39	65	39	100
7	25	42	25	100
8	39	65	39	100
9	60	100	60	100
10	60	100	60	100
11	34	57	34	100
12	43	72	43	100
13	50	83	50	100
14	55	92	55	100
15	55	92	55	100
16	18	30	18	100
17	45	75	35	78
18	34	57	10	29

Em todos os pontos coletados foi verificado um bom controle EPHHL ao glifosato, havendo 100% de mortalidade das populações testadas (Tabela 6.3). É importante salientar que, anteriormente ao levantamento efetuado em 2012 no Paraná, não havia suspeitas de resistência a esse mecanismo de ação e que, portanto, esse era o resultado esperado. Embora no Brasil esteja documentado um caso de EPHHL R ao glifosato (VIDAL et al., 2007b), levantamentos efetuados recentemente no Rio Grande do Sul não identificaram populações de EPHHL R ao glifosato (VARGAS et al. 2013). Isso ocorre, até o momento, à despeito da utilização de glifosato como principal herbicida utilizado no manejo de plantas de EPHHL e de outras espécies daninhas em áreas de soja e à despeito de que, em um grande percentual das propriedades amostradas, seja o único herbicida utilizado nas áreas cultivadas com soja. Porém, é importante salientar que a metodologia clássica para a detecção de resistência de plantas daninhas recomenda a utilização de curvas de resposta a doses de herbicida (RYAN, 1970). A aplicação dessa metodologia seria adequada para a detecção das diferenças entre populações e para uma avaliação mais criteriosa da evolução da resistência ao glifosato nas populações que foram

objeto de levantamento.

Tabela 6.3 - Avaliação dos 18 biótipos de *Euphorbia heterophylla* coletados na região Oeste e Sudoeste do Paraná, pela aplicação do herbicida inibidor da EPSPS. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Biótipos	Número de plantas emergidas	Percentual de plantas emergidas (%)	Número de plantas mortas	Percentual de plantas mortas (%)
1	60	100	60	100
2	46	100	46	100
3	47	78	47	100
4	21	35	21	100
5	37	62	37	100
6	44	73	44	100
7	20	33	20	100
8	45	75	45	100
9	59	98	59	100
10	55	92	55	100
11	38	63	38	100
12	48	80	48	100
13	50	83	50	100
14	50	83	50	100
15	55	92	55	100
16	13	22	13	100
17	25	42	25	100
18	19	32	19	100

As doses de glifosato utilizadas pelos agricultores variam entre 720 e 1260 g e.a. ha<sup>-1</sup>. O levantamento constatou que em 72% das propriedades analisadas os agricultores consideraram baixo grau de dificuldade de controle de EPHHL; 22% apresentavam médio grau de dificuldade e em apenas 6% o grau de dificuldade de controle de EPHHL foi considerado elevado. Esses resultados sugerem, portanto, que para os graus de média e alta dificuldade, a causa das falhas de controle observadas nas áreas onde as sementes de EPHHL foram coletadas não se relacione com a resistência ao glifosato, mas com práticas inadequadas como uso de subdoses, problemas com a tecnologia de aplicação, etc., que favorecem falhas no controle deste herbicida (VARGAS et al., 2013). Além dos fatores apontados acima, também as aplicações em pós-emergência na soja RR em muitas propriedades tem sido realizadas em áreas sem o uso do manejo de pré-plantio, o que proporciona plantas de EPHHL com estágio muito avançado de desenvolvimento para as aplicações, dificultando o seu controle (MAROCHI et al., 2008).

Para impedir e/ou minimizar o surgimento de plantas R aos herbicidas e combater os casos já existentes, é necessário que ocorram modificações nas práticas agrícolas utilizadas nas propriedades, como utilização mais racional dos herbicidas e emprego de rotação de herbicidas que possuam diferentes mecanismos de ação, o que diminuirá a pressão de seleção exercida por estes (WINKLER et al., 2003).

Como enfatizado por Vidal et al. (2004) e Hernandez et al. (2005), há necessidade de conscientizar agricultores e legisladores quanto à necessidade de rotação e principalmente de misturas de herbicidas pertencentes a mecanismos de ação diferentes, de forma que essas técnicas possam ser empregadas na prevenção à resistência de plantas daninhas.

## 6.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que todos os biótipos de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS permanecem nas áreas mesmo após longo período de constatação da resistência.

A resistência aos inibidores da PROTOX permanece nas áreas mesmo após vários anos de surgimento, no entanto em menor frequência que a resistência aos inibidores da ALS.

Com a metodologia utilizada, constatou-se que o controle das populações resistentes aos inibidores da ALS/ PROTOX com glifosato foi eficiente, mas metodologia clássica de detecção da resistência deveria ser adotada para melhor entendimento da sua evolução nas populações.

O manejo adotado nas propriedades levantadas é na maioria inadequado, necessitando a adoção de rotação de culturas, rotação e/ou associação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, para manter viáveis as tecnologias de culturas geneticamente modificadas resistentes aos herbicidas.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX em *Euphorbia heterophylla* é um problema para as áreas agrícolas. Registros de resistência múltipla a esses mecanismos foram confirmados no Brasil, na região Sudoeste do Paraná. Mas, novos casos têm sido documentados. Para exercer um controle eficiente dessas populações resistentes há necessidade de descobrir quais os níveis de resistência destas populações, assim como, quais os grupos químicos de inibidores da ALS e PROTOX são abrangidos. Além disso, faz-se necessário o conhecimento dos mecanismos que determinam a resistência a estes mecanismos de ação. Para a execução de práticas de manejo adequadas também é importante conhecer o comportamento das populações resistentes ao longo do tempo, pois as alternativas de controle químico vão mudando, à medida que novas tecnologias e cultivares são introduzidas no mercado. O conhecimento do comportamento destas populações resistentes nas áreas de lavoura ao longo do tempo permite a adoção de estratégias de manejo que combatam a sua evolução e permanência nas áreas. Assim sendo, a presente dissertação trata de um conjunto de estudos sobre a resistência de biótipos de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS/PROTOX, sobre o qual seguem algumas considerações.

Com o primeiro capítulo da dissertação confirmou-se que os quatro biótipos de *E. heterophylla* com suspeita de resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX apresentam a resistência aos herbicidas inibidores da ALS sendo esta cruzada aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidilbenzoatos e sulfonanilidas. Estes biótipos apresentaram resistência a herbicidas que nunca foram aplicados anteriormente nestes biótipos. Esta informação é de grande importância quanto ao conhecimento do comportamento da resistência aos inibidores da ALS em populações de *E. heterophylla*.

No segundo capítulo constatou-se que todos os biótipos com suspeita de resistência múltipla apresentaram resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX, sendo esta resistência cruzada aos grupos dos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas, oxadiazol e pirimidinedione. Estas informações servem de alerta, pois estas são populações pertencem a áreas distintas, algumas delas muito distantes geograficamente e, mesmo assim, apresentam características similares de

resistência cruzada a todos os grupos químicos testados. E também resistência a herbicidas que nunca foram anteriormente aplicados.

Buscando conhecer os mecanismos de resistência aos inibidores da ALS, no terceiro capítulo confirmou-se que a resistência dos biótipos de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS é atribuída à menor sensibilidade desta enzima a estes herbicidas. Também houve aumento da afinidade dos biótipos resistentes pelo substrato piruvato, decorrente da resistência, sugerindo que a alteração na sequência de aminoácidos resultou em maior atividade da enzima ALS, comparativamente ao biótipo Suscetível.

O quarto capítulo buscou verificar se as atividades das enzimas antioxidantes estão envolvidas no mecanismo de resistência aos inibidores da PROTOX, observou-se a resposta das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e catalase dos biótipos Suscetível, Medianeira, Vitorino, Vilhena e Bom Sucesso do Sul, apresentaram aumento da atividade, pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX testados. Além disso, para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vitorino, pode-se afirmar que a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e peroxidase pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência aos inibidores da PROTOX. Enquanto a enzima catalase pode ser um mecanismo complementar envolvido nesta resistência. Com estes dois capítulos de análises enzimáticas evidenciou-se que os mecanismos de resistência tanto aos inibidores da ALS quanto da PROTOX em biótipos de *E. heterophylla* estão relacionados com atividades bioquímicas na planta.

E por fim, no quinto capítulo observou-se que populações de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS detectados em levantamentos efetuados no passado, permanecem nas áreas de lavoura, mesmo após longo período de constatação da resistência. Esta informação é um alerta para dificuldades que possivelmente serão encontradas no manejo da espécie *E. heterophylla* em áreas implantadas culturas geneticamente modificadas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, que deverão ser lançadas no mercado brasileiro nos próximos anos. Também se constatou que a população ativa de plantas resistentes aos inibidores da PROTOX permaneceu nas áreas, mesmo após vários anos após levantamentos pioneiros, no entanto em menor frequência que as resistentes aos inibidores da ALS. As populações levantadas foram bem controladas com o herbicida glyphosate. Com a realização deste trabalho chama atenção o fato

que o manejo adotado na maior parte das propriedades levantadas é inadequado, necessitando ser implantada nestas áreas, rotação de culturas, rotação e/ou associação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, para que se mantenham viáveis as tecnologias de culturas geneticamente modificadas resistentes aos herbicidas. No entanto, deverão ser procedidas maiores investigações sobre o comportamento dos bancos de sementes destas áreas, visando observar quais espécies daninhas estão presentes, e quais períodos que estas sementes estão dormentes nestas áreas, para assim entender mais sobre o comportamento da persistência destas populações resistentes nestes locais.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, J. R. et al. Efeito do herbicida chlorimuron-ethyl em biótipos resistente e suscetível de *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 26, p. 911-916, 2008.
- ADAMI, M. et al. Estimativa de área de folíolos de soja usando imagens digitais e dimensões foliares. **Bragantia**, v. 67, p.1053-1058, 2008.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 105, p.121-126, 1984.
- ALI, A. Use of image analysis to assess color response on plants caused by herbicide application. **Weed Technology**. v. 27, p.604–611, 2013.
- ALMAGRO, L. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 377–390, 2009.
- ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Dispersão e banco de sementes. In: Ferreira, A. G.; Borguetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 227-235.
- ALSCHER, R. G. et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1331–1341, 2002.
- AMARANTE JR., O. P.; SANTOS, T. C. R. Revisão: glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, p. 589-593, 2002.
- ANDERSON, M. D. et al. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of mayze seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p.1247- 1257, 1995.
- ANDRES, A. et al. Detecção da resistência de Capim-arroz (*Echinochloa* sp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 25, p. 221-226, 2007.
- ARAÚJO, J. R. G. et al. Alteração na atividade de peroxidase e concentração de fenóis em microtangerinas (*Citrus* spp.) infectadas por *Phytophthora parasitica* **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, p. 1-5, 2008.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASHIGH, J.; TARDIF, F. J. An Ala205Val substitution in acetohydroxyacid synthase of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science**, v. 55, p. 558-565, 2007.

ASHIGH, J. J.; HALL, C. Bases for Interactions between saflufenacil and glyphosate in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.7335–7343, 2010.

AVILEZ, I. M. et al. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v. 148, p.136-142, 2008.

BASF Agricultural Products. **KIXOR™ herbicide**: Worldwide Technical Brochure (GL-69288). Agricultural Products Division, Research Triangle Park, NC. 2008.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BECKIE, C. H. J. Herbicide-Resistant Weeds in the Canadian Prairies: 2007 to 2011. **Weed Technology**, v. 1, p. 171-183, 2013.

BIANCHI, M. A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 23, Porto Alegre, RS. Ata e Resumos... Porto Alegre, UFRGS, 1996, 125 p.

BIANCHI, M. A. CORRIOLAS ---- evolução e manejo em lavouras de soja. **Informativo Fundacep**. ANO XIV, N 04, 2007.

BOWLER C, et al. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROX, T. **From pixels to regions: Partial differential equations in image analysis** (PhD thesis). Saarland University, Saarbrücken. 2005.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: know and potential function. In: Everse, K.; Grisham, M.B (Eds). **Peroxidase in chemistry and biology**. New York: CRC Press, 1991. v. 2, p. 25.

CARVALHO, L. B. et al. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. **Planta Daninha**, v. 28, p. 33-39, 2010.

CASANO, L. M. et al. Inactivation and degradation of CuZn-Sod by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. **Plant and cell physiology**, v. 38, p. 433-440, 1997.

CASANO, L.M. et al. Leaf age and paraquat concentration dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. **Plant Science**, v. 149, p.13-22. 1999.

CATANEO, A. C. et al. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, p. 23 -31, 2005.

CHANDRAN, R. et al. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C**. v. 140, p.422-426, 2005.

CHANDRU, H. K. et al. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. **Plant Science**, v. 164, p. 935– 941, 2003.

CHEMALE, V. M.; FLECK, N. G. Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em competição com *Euphorbia heterophylla* L. sob três densidades e dois períodos de ocorrência. **Planta Daninha**, v. 5, p. 36-45, 1982.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Imidazolinone resistant *B. pilosa* biotypes in the Brazilian soybean areas. In: MEETING OF THE WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 36., 1996, Norfolk. **Abstract**. Champaign: WSSA, 1996. p. 10.

CHRISTOFFOLETI, P. J. ; VICTÓRIA FILHO, R.; MONQUERO, P. A. Resistência cruzada e herbicidas alternativos de controle de biotipos de *Bidens pilosa* resistentes

aos herbicidas inibidores da ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., Caxambu, 1997. **Resumos...** Caxambu: SBCPD, 1997. p.64.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Bioensaio para determinação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Bragantia**, v.60, p. 261-265, 2001.

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

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glifosato. **Planta Daninha**, v. 21, p. 507-515, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3 ed. Piracicaba : HRAC-BR. 2008.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: Christoffoleti, P. J. (Orgs.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**.. 3.ed. Piracicaba: HRAC-BR, p. 3-26, 2008.

COTTERMAN, J. C.; SAARI, L. L. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl resistant Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 43, n. 3, p. 182-192, 1992.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, 1981.

CRUZ-HIPOLITO, H. et al. Resistance mechanism to tribenuron-methyl in white mustard (*Sinapis alba*) from southern Spain. **Weed Science**, v. 61, p. 341-347, 2013.

D'ELYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science** , v. 69, p.176–187, 2013.

DAL MAGRO, T. et al. Propriedades enzimáticas da enzima ALS de *Cyperus difformis* e mecanismo de resistência da espécie ao herbicida pyrazosulfuron-ethyl.

**Ciência Rural**, v. 40, p. 2439-2445, 2010.

DAN, H. A. Histórico da infestação de buva resistentes a herbicidas no mundo e no Brasil. In: Constantin, J. et al. (Eds.). **Buva: Fundamentos e Recomendações para Manejo**. Curitiba, PR: Omnipax, p. 5 -10, 2013.

DAYAN, F. E. et al. Physiological basis for differential sensitivity to sulfentrazone by sicklepod (*Senna obtusifolia*) and coffee senna (*Cassia occidentalis*). **Weed Science**, v. 44, p. 12-17, 1996.

DAYAN, F. E. et al. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. **Weed Science**, v. 45, p. 634–641, 1997.

DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Phytotoxicity of Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors: Phenomenology, Mode of Action and Mechanisms of resistance. In: Roe, R.M. et al (Eds). **Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology**. 1997.

DAYAN, F.E. et al. Biochemical and structural consequences of a glycine deletion in the alpha-8 helix of protoporphyrinogen oxidase. **Biochim Biophys Acta**. v. 1804, p.1548-56, 2010.

DAYAN, F.E., DUKE, S.O. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides, In: Krieger, R., et al. Eds.. **Haye's Handbook of Pesticide Toxicology**, 3rd ed. Academic Press-Elsevier: San Diego, CA, USA, p. 1733-1751, 2010.

DAYAN, F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, p.182–190, 2011.

DE TULLIO, M.; ARRIGONI, O. Ascorbate peroxidase activity in resistant and susceptible plants of *Lycopersicon esculentum*. **Bollettino della Società Italiana di Biologia sperimentale**. v. 68, p.613-617, 1992.

DEKKER, J.; DUKE, S.O. Herbicide resistant field crop. **Advances in Agronomy**. v. 54, p. 69-116, 1995.

DEL LONGO, O. et al. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p.1023-1028, 1993.



DEVINE, M. et al. Other herbicidal interaction with photosynthesis. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: Prentice-Hall, 1993.

DEVINE, M. D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v. 19, p. 881-889, 2000.

DEWAELE, E. et al. Biochemical characterization of chlorsulfuron resistance in *Cichorium intybus* L. var. Witloof. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, p. 109-114, 1997.

DODGE, A. D. The mode of action of bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. **Endeavour**, v. 30, p.130-5, 1971.

DUKE, S. O., et al. **Herbicide- Resistant Crops**. Comments from CAST 1991-1, Council of Agricultural Science and Technology, Ames, I.A. 1991.

DURNER, J. et al. New aspects of inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. **Plant Physiology**. v. 95, p.1144-1149, 1991.

EASTIN, E. F. Fate of fluorodifen in resistant peanut seedlings. **Weed Science**, v. 19, n. 2, p. 261–265, 1971.

ELSTNER, E. F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p.73-96, 1982.

FERREIRA, M. E. et al. **Uso de imagens digitais na avaliação do crescimento da taxa de cobertura do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrado, Edição 21. 2001.

FERREIRA, F. A. et al. Mecanismo de ação de herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2005, Salvador, BA. Disponível em: [http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/336.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf). Acesso em 11/12/2013.

FERREIRA, L. C. **Ação protetora do oxido nítrico em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) submetidas ao lactofen**. 2007. 155P. Tese (doutorado) -Instituto de Biociências, UNESP -Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v.155, p. 93–100, 2011.

FRANS, R. et al. Experimental design and techniques for measuring plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N. D. **Research methods in weed science**. 3.ed. Champaign: Southern Weed Science Society, 1986. p. 29-46.

FREAR, D. S.; SWANSON, H. R. Metabolism of substituted diphenyl ether herbicides in plants. I. Enzymatic cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum sativum* L.). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 3, p. 473–482, 1973.

FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutases**. In: Advances in enzymology and related areas of molecular biology. v. 58, 1986, p.61-97.

FRISVOLD, G. B. Adoption of best management practices to control weed resistance by corn, cotton, and soybean growers. **AgBioForum**, v. 12, p. 370-381, 2009.

GASPAR, T., et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, v. 64, p. 418-423, 1985.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, v. 16, p. 117-125, 1998.

GAZZIERO, D. L. P. et al. **Critérios para Relatos Oficiais Estatísticos de Biótipos de Plantas Daninhas Resistentes a Herbicidas**. Sete Lagoas: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas/Campinas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas no Brasil, 2008.

GELMINI, G. A. et al. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, v. 60, p. 93-99, 2001.

GELMINI, G. A. et al. Resistance of *Euphorbia heterophylla* L. to ALS-inhibiting herbicides in soybean. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 452-457, 2005.

GERWICK, B. C. et al. Rapid diagnosis of ALS/AHAS inhibitor herbicide resistant weeds. **Weed Technology**, v. 7, p. 519-524, 1993.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 487-494, 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309- 314, 1977.

GROPPIA, M. D. et al. Activity and expression of peroxidases from sunflower: effect of development. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 55-59, 1999.

HA, S. B., et al. Transgenic rice plants expressing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene show low herbicide oxyfluorfen resistance. **Biologia Plantarum**, v. 47, p.277–280, 2003.

HAN, H. et al. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1164–1170, 2012.

HAO, G. F. Understanding the mechanism of drug resistance due to a codon deletion in protoporphyrinogen oxidase through computational modeling. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 4865-75, 2009.

HASSAN, N. M.; ALLA, M. M. N. Oxidative stress in herbicide-treated broad bean and maize plants. **Acta physiologiae plantarum**, v. 27, p. 429-438, 2005.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84: p. 450-455, 1987.

HEAP I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science** (ONLINE). 2013.

HEAP, I. **International survey of herbicide-resistant weeds**. 2014. Disponível em: < <http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

HENRY, W. B., et al. Remote sensing to detect herbicide drift on crops. **Weed Technology**, v. 18, p. 358–368. 2004.

HERNANDES, G. C. et al. Levantamento de práticas agronômicas e distribuição

geográfica de *Bidens* spp. resistentes aos herbicidas inibidores de ALS nos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. **Planta Daninha**, v. 23, p. 677-682, 2005.

HESS, F. D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: **Herbicide action course**. Summary of lectures. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.

HESS, F. D. Review Light – dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v. 48, p.160-70, 2000.

HILTON, H. W. Herbicide tolerance strain of weeds. **Hawaiian Sugar Planters Association. Annual Report**, p. 69, 1957.

HRAC, **The World of Herbicides**, 2010. Disponível em: <<http://www.hracglobal.com/Portals/5/moaposter.pdf> >. Acesso em: 29 jan. 2014.

HUANG, Y., et al. Airborne remote sensing assessment of the damage to cotton caused by spray drift from aerially applied glyphosate through spray deposition measurements. **Biosystems Engineering**, v. 107, p. 212–220, 2010.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, v. 60, p. 651-674, 2002.

IHARA, **Staple 280 CS**. Disponível em: <<http://www.ihara.com.br/defensivos/herbicidas/staple-280-cs/87/> >. Acesso em: 12 dez 2013.

II JUNG, H.; KUK, Y. I. Resistance mechanisms in protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice. **Journal of Plant Biology**, v. 50, p. 586-594, 2007.

IVANOV, S. et al., Effect of prolonged action of subherbicide concentrations of 2,4-d on the activities of some stress defence enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) plants. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v. 55, p. 81-84, 2002.

JADOSKI, S. O. et al. Peroxidase enzyme (EC.1.11.1.7) activity as an indicator of water stress in sweet pepper plants. **Acta Horticulturae (ISHS)** v. 697, p. 517-522, 2005.

JANICKA, U. et al., The effect of haloxyfop-ethoxyethyl on antioxidant enzyme activities and growth of wheat leaves (*Triticum vulgare* L.). **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 17, p. 485-490, 2008.

JIANG, G.; YANG, H. Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1687-1693, 2009.

KAJINO, H. S. Evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: PROCEEDINGS OF THE 9TH BRAZILIAN CONFERENCE ON DYNAMICS CONTROL AND THEIR APPLICATIONS, 2010.

KARAM, D. et al. Estudo da interferência das plantas daninhas com a cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS DANINHAS, 19, 1993, Londrina. Resumos. Londrina: SBCPD, p.32-33, 1993.

KENYON, W. H.; DUKE, S. O. Effects of acifluorfen on endogenous antioxidants and protective enzymes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. **Plant Physiology**. v. 79, p. 862-866, 1985.

KIM, S. et al. An active site arginine residue in tobacco acetolactate synthase. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 24, p. 1799- 1804, 2003.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 1. ed. São Paulo: Basf Brasileira, 603 p. 1992.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: Basf Brasileira S.A.,1996. 33 p.

KRAUS, T. E.; FLETCHER, A. Paclobutrazol protects wheat seedling from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? **Plant and Cell Physiology**, v. 35, p. 45-52, 1994.

KROHLING, C. A. **Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas de café Conilon (*Coffea canephora*) e na microbiota do solo**. 2010. Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Centro Universitário Vila Velha, 2010.

LACERDA, A. L. S. **Fluxos de emergência e banco de sementes de plantas**

**daninhas em sistemas de semeadura direta e convencional e curvas dose-resposta ao Glifosato.** 2003. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba 2003.

LACERDA, A. L. S.; VICTORIA FILHO, R. Curvas dose-resposta em espécies de plantas daninhas com o uso do herbicida glifosato. **Bragantia**. v.63, p.73-79, 2004.

LAM, W. G. et al. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. **Aquaculture**, v. 131, p. 219-230,1995.

LAMEGO, F. P. **Elucidação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS na espécie poliploide *Bidens subalternans* DC.** 2008. 151 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LANDSTEIN, D., et al. Relationships among the herbicide and functional sites of acetohydroxy acid synthase from *Chlorella emersonii*. **Planta**, v.191, p.1-6, 1993.

LANGARO, A. C. et al. Ativação do sistema antioxidante enzimático em plantas de arroz submetidas à aplicação de penoxsulam. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, Santa Maria, RS, 2013.

LAPLANTE, J. et al. Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 577-585, 2009.

LEITE, C. R. F., et al. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos e agronômicos dos herbicidas inibidores da ALS (AHAS).** Londrina: Ed. Dos Autores, 1998.

LEÓN, A. M. et al. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.813-820, 2002.

LI, J. et al. Physiological basis for resistance to diphenyl ether herbicides in common waterhemp (*Amaranthus rudis*). **Weed Science**, v. 52, p. 333-338, 2004.

LIMA, G. P. P. et al. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 21-25, 1999.

LLEWELLYN, R. S.; POWLES, S. B. High Levels of Herbicide Resistance in Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) in the Wheat Belt of Western Australia. **Weed Technology**, v. 15, p. 242-248, 2001.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo, Plantarum, 2006.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 244-249, 1999.

MALAN, C.; GREYLING, M. M.; GRESSEL, J. Correlation between Cu-Zn Superoxide dismutase and Glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbred. **Plant Science**, v. 69, p.157-66, 1990.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of alga cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MARKKOLA, A. M. et al. Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of *Pinus sylvestris*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 52, p.149-156, 1990.

MAROCHI, A. I. et al. Estudo de doses de glifosato em pós emergência da soja Roundup Ready®, em áreas consideradas com problemas de controle de *Euphorbia heterophylla* no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 26., 2008, Ouro Preto, MG. Resumos... Ouro Preto: 2008. Disponível em: <<http://www.sbcpd.org/Congresso/default.asp>>. Acesso em 23 jan. 2014.

MASSA, D. et al. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. **Weed Research**, v. 51, p. 294-303, 2011.

MATTERS, G. L.; SCANDALIOS, J. G. Effect of free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (SOD) genes in maize. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 882, p. 29-38, 1986.

MCNAUGHTON, K. E. et al. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, v.53, p. 17-22, 2005.

MENEZES, S. M. et al. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, p.150-155, 2004.

MENNE, H.; KOCHER, H. HRAC classification of herbicides and resistance Development. In: **Modern Crop Protection Compounds**, W. Kramer and U. Schirmer, Ed., p. 5-26, V.3 Wiley-VCH Publishing, Weingheim, Germany. 2007.

MEROTTO Jr., A.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da PROTOX. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, p. 138-148. 2001.

MESCHEDE, D. K. et al. Período crítico de interferência de *E. heterophylla* na cultura da soja sob baixa densidade de semeadura. **Planta Daninha**, v. 20, p. 381-387, 2002.

MESCHEDE, D. K. et al. Período anterior à interferência de plantas daninhas em soja: Estudo de caso com baixo estande e testemunhas duplas. **Planta Daninha**, v. 22, p. 239-246, 2004.

MITTAL, R.; DUBEY, R. S. Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 29, p.31-40, 1991.

MOHAN, R.; KOLATTUKUDY, P. E. Differential activation of expression of a suberization-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato lines by elicitors of *Verticillium albo-atrum*. **Plant Physiology**, v. 92, p. 276-280, 1990.

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

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

MONQUERO, P. A. et al., Saflufenacil no controle de *Luffa aegyptiana*, *Merremia cissoides*, *Mucuna aterrima* e *Ricinus communis*. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, p.176-182, 2011.

MONTAVON, P. et al. A simple method to measure effective catalase activities:



Optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical Biochemistry**, v. 360, p.207-215, 2006.

MORI, I. C.; SCHROEDER, I. J. Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. **Plant Physiology**, v. 135, p. 702–708, 2004.

NEIGHBORS, S.; PRIVALLE, L. S. Metabolism of primisulfuron by barnyardgrass. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 145-153, 1990.

NICOLAI, M. et al. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS (Grupo B). In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Orgs.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p. 35-49.

NORSWORTHY, J. K. et al. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, Special Issue, p.31–62, 2012.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Mecanismo de ação de herbicidas. In: **Plantas daninhas e seu manejo**. OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. (Coords.). Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 207-260.

OLIVEIRA, M. F. et al. Atividade da acetolactato sintase de plantas de milho e de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetíveis ao imazaquin. **Planta Daninha**, v. 20, p. 77-82, 2002.

OSUNA, M. D.; PRADO, R. *Conyza albida*: a new biotype with ALS inhibitor resistance. **Weed Research**, v. 43, p. 221–226, 2003.

OWEN, M. D. K. World maize/soybean herbicide resistance. In: POWLES, S. B.; SHANER, D. L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 101-164.

PANG, S. S. et al. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 7639-7644, 2003.

PARADEDA, N. L. et al. Efeito do herbicida Atrazina sobre o metabolismo intermediário e parâmetros reprodutivos de *Hyallophora* sp. In: Anais do XII Salão de

Iniciação Científica – PUCRS. 2011.

PARK, K. W. et al. Absorption, translocation, and metabolism of propoxycarbazone-sodium in ALS-inhibitor resistant *Bromus tectorum* biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 79, p. 18–24, 2004.

PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. **Plant and Cell Physiology**, v. 33, p. 957-61, 1992.

PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J. ALS mutations conferring herbicide resistance in waterhemp. **Proceedings of the North Central Weed Science Society**, v. 56, 2001.

PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J. Molecular analysis of cloransulam resistance in a population of giant ragweed. **Weed Science**, v. 50, p. 299-305, 2002.

PATZOLDT, W. L. et al. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 12329-12334, 2006.

PLAZA, G. A. et al. Absorção e translocação de imazethapyr como um mecanismo responsável pela resistência de *Euphorbia heterophylla* L. biótipos de acetolactato sintase (ALS) inibidores. **Agron. Colomb.**, v.24, 2006.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. **Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants**. Department of Crop Protection. Waite Agricultural Research Institute, South Australia. University of Adelaide, 1995. Disponível em : < <http://www.hracglobal.com/Education/HerbicideCrossResistanceandMultipleResistance.aspx> >.

PYON, J. Y. et al. Differential levels of antioxidants in paraquat-resistant and – susceptible *Erigeron canadensis* biotypes in Korea. **Weed Biology and Management**, v. 4, p.75–80, 2004.

RADETSKI, C. M. et al. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 221-229, 2000.

RASMUSSEN, J. et al. Assessment of leaf cover and crop soil cover in weed

harrowing research using digital images. **Weed Research**, v. 47, p. 299–310, 2007.

RIAR, D. S. et al. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 278-289, 2013.

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

RIZZARDI, M. A. et al. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 957-965, 2003.

RIZZARDI, M. A. et al. Interferência de populações de *Euphorbia heterophylla* E *Ipomoea ramosissima* Isoladas ou em misturas sobre a cultura de soja. **Planta Daninha**, v. 22, p. 29-34, 2004a.

RIZZARDI, M. A. et al. Manejo e controle de plantas daninhas em milho e sorgo. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.) **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004b. p. 571-594.

ROMAN, E.S. et al. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2007. 160p.

ROSENBAUM, K. K.; BRADLEY, K. W. A survey of glyphosate-resistant Waterhemp (*Amaranthus rudis*) in Missouri soybean fields and prediction of glyphosate resistance in future Waterhemp populations based on in-field observations and management practices. **Weed Technology**, v. 27, p. 656-663, 2013.

ROSSI, C. et al. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia agricola** v. 54, , 1997.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, p.197-199, 2001.

ROUSONELOS, S. I. et al. Characterization of a Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) Population Resistant to ALS- and PPO-Inhibiting Herbicides. **Weed Science**, v. 60, p. 335 – 344, 2012.

RYAN, G. F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. **Weed Science**, v. 18, p. 614-616, 1970.

SAHU, A. C.; MISHRA, D. Changes in some enzyme activities during excised rice leaf senescence under NaCl-stress. **Biochemie Physiologie der Pflanzen**, v.182, p.501-505, 1987.

SAVIC, J. et al. The activity of peroxidases and superoxide dismutases in transgenic phosphinothricin-resistant *Lotus corniculatus* shoots. **Arch. Biol. Sci.**, v.62, n.4, p.1063-1070, 2010.

SCALLA, R.; MATRINGE, M. Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase as herbicides: diphenyl ethers and related photobleaching molecules. **Weed Science**. v.6, p.103–132. 1994.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12. 1993.

SCANDALIOS, J. G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v. 156, p.103-110, 2000.

SEEFELDT, S. S. et al. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v. 9, p. 218-227, 1995.

SHAALTIEL, Y.; GRESSEL, J. Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 26, p. 22-28, 1986.

SHOUP, D. E. et al. Common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 51, p. 145-150. 2003.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 303-312, 1993.

SIGMAPLOT - Exact Graphy for Exact Science. Version 10.0, 2010.

SILVA, R. P. Absorção diferencial de herbicidas inibidores da enzima PROTOX como

provável causa da resistência em biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. **Synergismus scyentifica**, v.2, n.1,2,3,4. 2007.

SINGH, S. K. et al. Alterations in the activity of enzymes as a method to characterize herbicide tolerance. **International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research**. v. 1, p.74-79, 2010.

SINGH, S. P. et al. Growth and biochemical responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to different herbicides. **African Journal of Agricultural Research**. v. 8, p. 1265-1269, 2013.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, p. 9, 2007.

SOUZA, I. R. P. et al. Peroxidase activity in maize inbred lines resistant or susceptible to maize dwarf mosaic virus. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.2, p.1-8, 2003.

SOUZA, R. C. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Emilia coccinea* (Sims) F. Don E *Digitaria horizontalis* Willd. submetidas à mistura de clomazone+ametrina**. Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2009.

STIDHAM, M. A.; SINGH, B. K. Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. In: Shaner, D.L., O'Connor, S.L. **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.71-90.

SWITZER, C. M. The existence of 2,4-D resistant strains of wild carrot (*Daucus carota*). In: MEETING OF THE NEWSS, 11., Newss. **Proceedings ... Newss**, p. 315-318, 1957.

TAN, M. K. et al. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Weed Research**, v. 47, p.534-541. 2007.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.3, p.373- 84, 2000.

THOMAS, W. E. et al., Uptake, translocation, and metabolism of sulfentrazone in peanut, prickly sida (*Sida spinosa*), and pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*).

**Weed Science**, v.53, n.4, p.446-450, 2005.

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

TRANEL, P. J. et al. **Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors**. Online <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 22 dez. 2013.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da ALS. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, p. 138-148. 2001.

TREZZI, M. M. et al. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science. Health- Part B**, v. 40, p. 101-109, 2005.

TREZZI, M. M. et al. Bioensaios para identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX. **Planta Daninha**, v. 24, p. 563-571, 2006.

TREZZI, M. M. et al. Local de absorção de fomesafen como mecanismo de resistência em biótipo de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores da PROTOX. **Planta Daninha**, v. 27, p. 139-148, 2009a.

TREZZI, M. M. et al. Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**, v. 27, p. 1075-1082, 2009b.

TREZZI, M. M. et al. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da PROTOX e da ALS. **Planta Daninha**, v. 29, p. 901-912, 2011a.

TREZZI, M. M. et al. Eletrolite leakage as a technique to diagnose *Euphorbia heterophylla* biotypes resistant to ppo-inhibitors herbicides. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 655-662, 2011b.

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

VARGAS, L. **Resistência de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS)** 2000. 69 f. Tese (Doutorado em

Fitotecnia)- Programa de Pós- Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 19, p. 331-336, 2001.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 22 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 58). Disponível em:< [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do58.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do58.htm)> . Acesso em 31 dez. 2013.

VARGAS, L. et al. Práticas de manejo e a resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da ALS e tolerância ao glifosato no Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 427-432, 2013.

VEITCH, N. C. Structural determinants of plant peroxidase function. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 3-18, 2004.

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.

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf,. p. 138-148. 2001.

VIDAL, R. A. et al. A field survey of crop management practices and distribution of ALS resistant *Euphorbia heterophylla* in two states in southern Brazil. **Planta Daninha**, v. 22, p. 403-410, 2004.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: II – distribuição geográfica e caracterização genética de biótipos do planalto do Rio Grande do Sul. **R. bras. Agrociência**, v.10, p. 461-465, 2004.

VIDAL, R. A. et al. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 24, p. 597-604, 2006.

VIDAL, R. A. et al. Definindo resistência aos herbicidas. **Revista Plantio Direto**, v.

100, p. 18-19, 2007 a.

VIDAL, R. A. et al. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 5, p. 265-269. 2007b.

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathol.**, v. 36, p. 73-80, 2010.

VOLL, E. et al. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com a cultura de soja. **Planta Daninha**, v.20, n.1, p.17-24, 2002.

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

WARABI, E. et al. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen by overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. **Pest Management Science**, v. 57, p.743–748, 2001.

WEED SCIENCE. **Herbicide resistant weeds summary table**. Disponível em:<<http://www.weedscience.com/summary/home.aspx>>. Acesso em 01 set. 2013.

WHALLEY J.; SHANMUGANATHAN S. Applications of image processing in viticulture: A review. In: **20th International Congress on Modelling and Simulation**, Adelaide, Australia, 2013.

WINKLER, L. M. et al. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Plantio Direto**, v. 70, p. 21-24, 2002.

WINKLER, L. M. et al. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1067-1072, 2003.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: distribuição e genética de biótipos do estado do Paraná. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 85-92, 2004.



WRIGHT, T. R. et al. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. **Weed Sci.**, v. 46, p. 13-23, 1998.

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

YAMASHITA, O. M.; GUIMARÃES, S. C. Biologia e resistência a herbicidas de espécies do gênero *Conyza*. **Ambiência**, v.7, p.383 – 398, 2011.

YAMAUTI, M, S, et al., Controle químico de biótipos de buva (*Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis*) resistentes ao glifosato. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 41, p. 495-500, 2010.

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

YU, Q. et al. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. **Pest Management Science**, v.64, p.1229-1236, 2008.

ZHENG, D. et al. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest Management Science**, v.67, p.1486-1492, 2011.

## ÍNDICE DE APÊNDICES

Apêndice A - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da ALS no biótipo suscetível, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - utfpr, pato branco – pr, 2014.....	201
Apêndice B - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da ALS nos biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira), avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	201
Apêndice C - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX no biótipo Suscetível, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	202
Apêndice D - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX nos biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira), avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	202
Apêndice E - Resumo da análise de variância da redução de pixels, pela resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX no biótipo Suscetível, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	202
Apêndice F - Resumo da análise de variância da redução de pixels, pela resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX nos biótipos resistentes, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	203
Apêndice G - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima ALS para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Suscetível pela aplicação dos herbicidas inibidores da ALS - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	203
Apêndice H - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima ALS para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Suscetível pela aplicação das doses de piruvato - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	204
Apêndice I - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima peroxidase para os biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Vilhena) pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	204
Apêndice J - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima peroxidase para o biótipo Suscetível pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	204
Apêndice K - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima superóxido dismutase para os biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Vilhena) pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	205
Apêndice L - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima superóxido dismutase para o biótipo Suscetível pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	205
Apêndice M - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima catalase para os biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Vilhena) pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	206
Apêndice N - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima catalase para o biótipo Suscetível pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....	206
Apêndice O- Localização, histórico, sistemas de manejo das áreas onde foram coletados biótipos de Euphorbia heterophylla no levantamento efetuado na região no ano de 2012. UTFPR, Campus Pato Branco 2014.....	207
Apêndice P - Questionário aplicado para cada área de coleta de sementes de Euphorbia heterophylla no ano de 2012. UTFPR, Campus Pato Branco 2014.....	210

## APÊNDICES

Apêndice A - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da ALS no biótipo suscetível, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	7	14	21	MPAV	MPAS
		Quadrado médio				
Herbicidas	3	460,14*	759,3*	692,92 <sup>ns</sup>	6447,52*	277,2 <sup>ns</sup>
Doses	6	2369,5*	8618,2 *	12747,5*	9062,89*	9625,7*
Herbicidas x Doses	18	43,97*	352,1*	1080,2*	2074,30 <sup>ns</sup>	594,9*
Resíduo	65	22,08	212,6*	555,3	1415,36	241,43
CV (%)		5,99	22,1	51,8	74,03	44

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice B - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da ALS nos biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira), avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	7	14	21	MPAV	MPAS
		Quadrado médio				
Biótipos	3	791,5*	1589,4*	5784,8*	53819,9*	4831,1*
Doses	6	6175,7*	11185,5*	22064,4*	22591,5*	24780,9*
Herbicidas	3	765,9*	1102,1*	2968,3*	11131,7 <sup>ns</sup>	85,4 <sup>ns</sup>
Biótipos x doses	18	89,3*	216,9 <sup>ns</sup>	1033,5*	6907,6 <sup>ns</sup>	261,8 <sup>ns</sup>
Herbicidas x doses	18	108,2*	294,7*	1215,1*	3082,5 <sup>ns</sup>	75,9 <sup>ns</sup>
Biótipos x herbicidas	9	101,5*	426,9*	1912,5*	16032,8*	123,8 <sup>ns</sup>
Biótipos X herbicidas X doses	54	78*	257,3*	1274,2*	3857,3 <sup>ns</sup>	150,2 <sup>ns</sup>
Resíduo	269	20,2	145,9	513,1	4851,9	190,2
CV (%)		5,5	16,3	38,3	34,1	50,8

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice C - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX no biótipo Suscetível, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G	7	14	21	MPAV	MPAS
	GL	Quadrado médio				
Herbicidas	4	795,7*	1014,8*	3021*	516,2*	1298,9*
Doses	6	7389,1*	9609,9*	13067,6*	9566,5*	9579,9*
Herbicidas x Doses	24	55,7*	134,8*	316,7*	196,6*	166,1*
Resíduo	105	27,9	57,4	66,7	129,2	77,7
CV (%)		8,9	13,9	14,8	22,2	15,9

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice D - Resumo da análise de variância da resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX nos biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Vilhena e Medianeira), avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação e na redução da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	7	14	21	MPAV	MPAS
		Quadrado médio				
Biótipos	3	3531,6*	10669,4*	12050,3*	10268,3*	11868,2*
Doses	6	26230,9*	38589,5*	54599,5*	59562,9*	54257,9*
Herbicidas	4	1004,2*	5213,6*	8529,5*	2441,7*	5341,5*
Biótipos x doses	18	159,8*	688,4*	805,5*	496,5*	505,3*
Herbicidas x doses	24	115,7*	453,6*	660,2*	142,4 <sup>ns</sup>	310,1*
Biótipos x herbicidas	12	320,5*	307,4*	805,5*	1792,4*	1855,2*
Biótipos X herbicidas X doses	72	58,5*	138,8*	250,5*	165,7*	229,9 <sup>ns</sup>
Resíduo	404	33,4	73,5	74,1	104,7	192,1
CV (%)		9,4	16,2	18,1	27,6	34,6

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice E - Resumo da análise de variância da redução de pixels, pela resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX no biótipo Suscetível, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	G	7	14	21
		Quadrado médio			
Herbicidas	4		3572,1*	866,1*	899,3*
Doses	6		16110,2*	21046,5*	21278,7*
Herbicidas x Doses	24		441,1 <sup>ns</sup>	353,4*	676,8*
Resíduo	103		381,9	88,4	159,7
CV (%)			52,7	31,9	38,2

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice F - Resumo da análise de variância da redução de pixels, pela resposta a dose dos herbicidas inibidores da PROTOX nos biótipos resistentes, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	7	14	21
		Quadrado médio		
Biótipos	3	17233,3*	5737,1*	1576,5*
Doses	6	58007,2*	74376,7*	76044,8*
Herbicidas	4	3739,8*	7870,7*	5209,9*
Biótipos x doses	18	1472,1*	925,9 <sup>ns</sup>	545,2 <sup>ns</sup>
Herbicidas x doses	24	674,5*	707,1 <sup>ns</sup>	725,8*
Biótipos x herbicidas	12	4610,9*	1882,4*	996,6*
Biótipos X herbicidas X doses	72	777,3*	598,1 <sup>ns</sup>	392,6 <sup>ns</sup>
Resíduo	387	409,6	611,5	394,5
CV (%)		49,9	22,4	14,1

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice G - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima ALS para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Suscetível pela aplicação dos herbicidas inibidores da ALS - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	Bom			GL	Suscetível
		Sucesso do Sul	Vitorino	Medianeira		
		Quadrado médio (QM)				
Herbicidas	2	572,93*	85,43*	3856,38*	2	1271,16*
Doses	5	986,33*	2267,83*	2546,15*	6	6019,23*
Herbicidas x doses	10	89,54*	41,56*	333,3*	12	211,05*
Resíduo	36	5,82	1,3	0,35	42	73,86
CV (%)		10,5	14,4	8,5		12,4

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice H - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima ALS para os biótipos Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Suscetível pela aplicação das doses de piruvato - UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	GL	Bom			GL	QM
		Sucesso do Sul	Vitorino	Medianeira		
		Quadrado médio (QM)				
Doses	7	0,016*	0,00049*	0,0012 <sup>ns</sup>	9	0,018 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	0,0020	0,00000056	0,0014	10	0,109
CV (%)		21,02	39,32	24,8		63,29

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice I - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima peroxidase para os biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Vilhena) pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G L	Saflufena	Carfentrazo	Flumiclora	Fomesafe	Oxadiazó
		cil	ne	c	n	n
		Quadrado médio				
Biótipos	3	49,4*	28,3*	35,4*	23,6*	14,3*
Doses	3	22,5*	6*	21,0*	19,7*	23,9*
Períodos	2	5*	11,2*	2,3*	3,5*	8,2*
Biótipos x Doses	9	7,8*	5,3*	2,7*	3,9*	4,3*
Períodos x Doses	6	6,7*	1,5*	1,8*	3*	3,9*
Biótipos x Períodos	6	0,3*	6,1*	4,7*	1,8*	5,0*
Biótipos X Períodos X doses	18	2,7*	2,1*	3*	3,8*	2*
Resíduo	49	0,23	0,08	0,11	0,18	0,11
CV (%)		15,2	11,8	10,8	13,7	10,4

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice J - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima peroxidase para o biótipo Suscetível pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G L	Saflufenaci	Carfentrazon	Flumiclorac	Fomesafe	Oxadiazó
		l	e		n	n
		Quadrado médio				
Períodos	2	3,8*	3,88*	5,6*	0,6*	10,7*
Doses	3	2,7*	3,99*	3,8*	5,9*	13,8*
Períodos x Doses	6	1,5*	1,4*	2,9*	4,3*	2,3*
Resíduo	13	0,05	0,02	0,03	0,018	0,15
CV (%)		13,3	7,8	7,9	6	11,2

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice K - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima superóxido dismutase para os biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Vilhena) pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G L	Saflufena	Carfentrazo	Flumiclora	Fomesafe	Oxadiazó
		cil	ne	c	n	n
		Quadrado médio				
Biótipos	3	286812,9*	222561,4*	553568,2*	344984,4*	123770,7*
Doses	3	13857,4 <sup>ns</sup>	158928,8*	47397,5*	25475,5*	2462,6 <sup>ns</sup>
Períodos	2	191881,7*	16778,2 <sup>ns</sup>	215200,4*	90779,8*	81229,7 <sup>ns</sup>
Biótipos x Doses	9	25497,3*	67586,6 <sup>ns</sup>	68538,8*	51224,1*	107134,1
Períodos x Doses	6	26970,9*	84372,9 <sup>ns</sup>	88726,1*	19437,9*	84705,4*
Biótipos x Períodos	6	40451,2*	333548,3*	57490,7*	24183*	246545,8
Biótipos X Períodos X Doses	18	44328,8*	135656,4*	81825,9*	28801,6*	47790,9 <sup>ns</sup>
Resíduo	49	8893,5	50491,9	3944,9	6687,4	35003,5
CV (%)		13,9	31,9	9,6	11,2	26,9

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice L - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima superóxido dismutase para o biótipo Suscetível pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G L	Saflufenaci	Carfentrazon	Flumiclorac	Fomesafe	Oxadiazó
		l	e		n	n
		Quadrado médio				
Períodos	2	63105,9*	1048,7 <sup>ns</sup>	43468,8 <sup>ns</sup>	94868,8*	179042,8*
Doses	3	44067,9*	41449,7 <sup>ns</sup>	28094,9 <sup>ns</sup>	171867,7*	106582*
Períodos x Doses	6	65433,6*	19627,7 <sup>ns</sup>	47983,6 <sup>ns</sup>	204528,5*	25285,3*
Resíduo	13	10137,6	43051,9	15898,1	4281,6	4562,5
CV (%)		16,1	33,3	19,7	8,9	9,3

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice M - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima catalase para os biótipos resistentes (Bom Sucesso do Sul, Vitorino, Medianeira e Vilhena) pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G L	Saflufena	Carfentrazo	Flumiclora	Fomesafe	Oxadiazó
		cil	ne	c	n	n
Quadrado médio						
Biótipos	3	86380,7*	30337,6 <sup>ns</sup>	1129525*	34731,8 <sup>ns</sup>	249190,9*
Doses	3	73415,4 <sup>ns</sup>	22573 <sup>ns</sup>	562422 <sup>ns</sup>	99399,8*	294429,3*
Períodos	2	607927,2*	618832,2*	2984566*	915943,8*	114056,6*
Biótipos x Doses	9	47281,3 <sup>ns</sup>	12108,8 <sup>ns</sup>	348221,8 <sup>ns</sup>	20357,6 <sup>ns</sup>	149354,7*
Períodos x Doses	6	48813,3 <sup>ns</sup>	37462,1 <sup>ns</sup>	384898,7 <sup>ns</sup>	125419,4*	224921*
Biótipos x Períodos	6	37914,2 <sup>ns</sup>	29892,2 <sup>ns</sup>	885677,2*	56261*	669443,5*
Biótipos X Períodos X Doses	18	31600,2 <sup>ns</sup>	23649,3 <sup>ns</sup>	520062,4*	25102,1 <sup>ns</sup>	219329,6*
Resíduo	49	30085,5	30656,9	229416,1	24689,2	28100,7
CV (%)		28,5	81,8	13,3	67,9	55,3

\*Teste f significativo a 5%

Apêndice N - Resumo da análise de variância no estudo da atividade da enzima catalase para o biótipo Suscetível pela aplicação das doses dos herbicidas inibidores da PROTOX- UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.

Causas da variância	G L	Saflufena	Carfentrazo	Flumiclora	Fomesafe	Oxadiazó
		cil	ne	c	n	n
Quadrado médio						
Períodos	2	32142,8 <sup>ns</sup>	36302,5 <sup>ns</sup>	71245,8 <sup>ns</sup>	29328,2 <sup>ns</sup>	108592,3 <sup>ns</sup>
Doses	3	86494,9 <sup>ns</sup>	131350,2*	300890*	55019,4 <sup>ns</sup>	170102,8 <sup>ns</sup>
Períodos x Doses	6	85157,8 <sup>ns</sup>	67796,7 <sup>ns</sup>	74502,9 <sup>ns</sup>	208065,1*	522948,9*
Resíduo	13	88654,5	39156,8	68316,7	46941,9	180722,2
CV (%)		61,8	46,35	62,2	44,0	42,5

\*Teste f significativo a 5%



Apêndice O- Localização, histórico, sistemas de manejo das áreas onde foram coletados biótipos de *Euphorbia heterophylla* no levantamento efetuado na região no ano de 2012. UTFPR, Campus Pato Branco 2014.

Biótipos	Localização	Coord. Geográfica	Histórico de resistência a ALS? Caso positivo, qual ano?	Histórico de resistência a PROTOX? Caso positivo, qual ano?	Ano de introdução de soja geneticam. modificada resistente ao glifosato	Sistema de rotação de culturas predominante e frequência da rotação	Herbicidas alternativos para controlar leiteiro	Colheita para vizinhos ou contratada?	Vizinhos com problemas de resistência a herbicidas?	Causa provável da resistência
1	Vitorino/Linha Rio Caçador	S 26°12'487" W52°41'557"	Sim. 2003	Sim. 2003	2005	Soja no verão e aveia no inverno	Não	Equipamentos próprios e colhe para vizinhos.	Sim	Falta de rotação de mecanismos de ação; uso de subdosagens
2	Itapejara D'Oeste/ Linha Santa Barbara	S 25°57'516" W52°49'685"	Sim. 2004	Não	2005	Soja no verão e trigo no inverno	Sim. 2,4-D	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos.	Sim	
3	Coronel Vívada/ Linha São Braz	S 26°11'043" W 52°47'594"	Sim. 2003	Não	2004	Soja no verão e trigo no inverno	Sim. 2,4-D, Produto fomulado de (Fluroxipir meptílico + Triclopir butotílico) + glifosato	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos.	Sim	
4	Coronel Vívada/ Linha Vista Alegre	S 26°15'175" W 52°79'598"	Sim. 2003	Não	2006	Soja e milho no verão. No inverno trigo e aveia, intercalado.	Não	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos	Sim	
5	Vitorino/Linha Vista Alegre	S 26°17'874" W52°45'996"	Sim. 2003	Não	2007	Soja, milho e feijão no verão. Trigo e aveia no inverno.	Não	Equipamentos próprios e colhe para vizinhos.	Sim	
6	Pato Branco /	S 25°10'242"	Sim. 2003	Sim.	2010	Soja e milho no	Não	Equipamentos	Sim	

	Linha independência	W 53°52'405"		2003		verão. Pousio, trigo, aveia no inverno.		próprios e não colhe para vizinhos	
7	Pato Branco / Linha Sede Gavião	S 26°06'290" W 52°45'716"	Sim. 2002	Não	2004	Soja no verão e aveia no inverno.	Não	Equipamentos próprios e colhe para vizinhos.	Sim
8	Pato Branco / Linha Bela vista	S 26°02'904" W 52°43'990"	Sim. 2003	Não	2005	Soja e milho no verão. Trigo e aveia no inverno.	Não	Não possui equipamentos próprios para colheita	Sim
9	Bom Sucesso do Sul/ Linha Alto Paraíso	S 25°58'915" W 52°47'203"	Sim. 2003	Não	2008	Soja e milho no verão. Trigo e aveia no inverno.	Sim. Metsulfuron (inverno)	Equipamentos próprios e colhe para vizinhos.	Sim
10	Bom Sucesso do Sul/ Linha Nossa Senhora Aparecida	S 25°58'951" W 52°42'305"	Sim. 2003	Não	2008	Soja e milho no verão. Trigo no inverno.	Sim. 2,4-D	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos	Sim
11	Itapejara D'Oeste-Linha Barra do Vitorino	S 25°57'562" W 52°49'438"	Sim. 2005	Não	2008	Soja no verão. Trigo no inverno.	Sim. 2,4-D	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos	Sim
12	Itapejara D'Oeste-Linha Água Verde	S 26°11'562" W 52°47'594"	Sim. 2005	Não	2005	Soja e milho no verão. Pousio no inverno.	Não	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos	Sim
13	Itapejara D'Oeste-Linha Santa Barbara	S 26°11'105" W 52°49'590"	Sim. 2005	Não	2005	Soja e milho no verão. Trigo e aveia no inverno.	Sim, 2,4-D e clorimuron.	Equipamentos próprios e não colhe para vizinhos	Sim
14	Itapejara D'Oeste-Linha	S 26°11'043" W 52°47'087"	Sim. 2005	Não	2005	Milho no verão. Aveia no	Sim, 2,4-D e clorimuron.	Não possui equipamentos	Sim

	Santa Barbara					inverno.		próprios para colheita	
15	Itapejara D'Oeste-Linha Água Verde	S 25°57'513" W 52°49'682"	Sim. 2004	Não	2004	Soja e Milho no verão. Aveia no inverno.	Sim, 2.4-D	Equipamentos próprios e colhe para vizinhos	Sim
16	Medianeira/ Linha Ocoy	S 25°24'365" W 54°03'035"	Sim. 2007	Sim. 2007	2008	Soja no verão. Milho safrinha, trigo e aveia no inverno.	Não	Não possui equipamentos próprios para colheita	Não
17	Medianeira/ Linha Ocoy	S 25°24'46" W 54°03'390"	Sim. 2007	Sim. 2007	2008	Soja no verão. Milho safrinha, trigo e aveia no inverno.	Não	Não possui equipamentos próprios para colheita	Não
18	Medianeira/ Linha Ocoy	S 25°24'636" W 54°03'650"	Sim. 2007	Sim. 2007	2008	Soja no verão. Milho safrinha, trigo e aveia no inverno.	Não	Não possui equipamentos próprios para colheita	Não

Apêndice P - Questionário aplicado para cada área de coleta de sementes de *Euphorbia heterophylla* no ano de 2012. UTFPR, Campus Pato Branco 2014.

### 1) Informações da Propriedade

Proprietário: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_

Localidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Localização geográfica com GPS da área de coleta: \_\_\_\_\_

Tamanho da área: \_\_\_\_\_

2) Há quantos anos substituiu a soja convencional pela SOJA R ao glifosato? \_\_\_\_\_

3) Tem observado problemas de resistência de plantas daninhas a herbicidas nos últimos anos? \_\_\_\_\_

### 4) Esquema de Rotação de Culturas na área.

Quais culturas foram semeadas nesta área (onde foi coletado Leiteiro)?

ANO	VERÃO	INVERNO
2011	_____	_____
2010	_____	_____
2009	_____	_____
2008	_____	_____
2007	_____	_____
2006	_____	_____

#### 1) Herbicidas utilizados na área:

	SOJA	MILHO	FEIJÃO	INVERNO
Herbicidas utilizados na última safra (2011/2012)				
Herbicidas utilizados no inverno passado (2011)				
Herbicidas utilizados no verão passado (2010/2011)				
Herbicidas utilizados dois invernos passados (2010)				
Herbicidas utilizados dois verões passados (2009/2010)				
Herbicidas utilizados três invernos passados (2009)				
Herbicidas utilizados três				

verões (2008/2009)	passados				
-----------------------	----------	--	--	--	--

**6) Quanto ao grau de dificuldade para controlar Leiteiro, assinale:**

( ) Baixo grau de dificuldade; ( ) Médio grau de dificuldade; ( ) Alto grau de dificuldade.

**7) Além de inibidores da glifosato, utiliza outros herbicidas para controlar leiteiro e outras espécies de folhas largas? Em caso afirmativo, indique:**

Dessecantes: \_\_\_\_\_

Pré-emergentes: \_\_\_\_\_

Pós-emergentes: \_\_\_\_\_

**8) Considerando todas as plantas daninhas presentes nas áreas da propriedade, coloque em ordem numérica crescente do menor para o maior grau de dificuldade de controle (ex: 1 = menor dificuldade; 10 = maior dificuldade):**

Leiteiro ( )

Buva ( )

Guanxuma ( )

Azevém ( )

Trapoeraba ( )

Picão preto ( )

Cordas-de-viola ( )

Capim amargoso ( )

Poaia-branca ( )

Outra espécie ( ) Qual?

**9) Informações sobre a colheita**

Possui equipamentos próprios para a colheita ou alugados?: \_\_\_\_\_.

Se possuir equipamentos próprios para a colheita, realiza colheita para os vizinhos?: \_\_\_\_\_.

Os vizinhos apresentam casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas?: \_\_\_\_\_. Em caso afirmativo, quais espécies: \_\_\_\_\_