

## Resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio e herbicidas alternativos para o controle

Mariani, Franciele<sup>1,4</sup>; Leandro Vargas<sup>2</sup>; Dirceu Agostinetto<sup>3</sup>; Diego Severo Fraga<sup>3</sup>; Fernando Machado dos Santos<sup>1</sup>; Sandro Roberto Piesanti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal do Rio Grande do Sul – *Câmpus* Sertão, Rodovia RS 135, Km 25, Distrito Eng. Luiz Englert, 99170-000, Sertão, RS, Brasil; <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. BR 285 Km 174, Caixa Postal 3081 Industrial, CEP 99001970 - Passo Fundo, RS, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Campus Universitário s/nº, 96010-900, Caixa Postal, 354, Pelotas, RS, Brasil; <sup>4</sup>marianifranciele@gmail.com

Mariani, Franciele; Leandro Vargas; Dirceu Agostinetto; Diego Severo Fraga; Fernando Machado dos Santos; Sandro Roberto Piesanti (2016) Resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio e herbicidas alternativos para o controle. Rev. Fac. Agron. Vol 115 (1): 35-43

Sementes de biótipos suspeitos de resistência ao iodosulfurom foram coletadas em lavouras do Rio Grande do Sul (RS/Brasil) objetivando identificar o nível de resistência, metabolismo, atividade da enzima ALS e herbicidas alternativos para o controle. O nível de resistência para os biótipos resistentes (Joi e Col) e suscetível foi avaliado com 13 doses do herbicida iodosulfurom (0 à 384 g i.a ha<sup>-1</sup>), aplicadas no estágio vegetativo de 3-4 folhas. A metabolização foi avaliada pela aplicação de malathion, inibidor das izoenzimas P450. Em laboratório foi avaliada a sensibilidade da ALS dos biótipos a diferentes concentrações do iodosulfurom (0 à 500 µM). Herbicidas alternativos para controle do azevém resistente foram avaliados em dois experimentos (herbicidas pré-emergentes ou pós-emergentes). De acordo com os resultados para controle equivalente dos biótipos resistentes são necessárias doses de iodosulfurom superior a 10 (Col) e 8 (Joi) vezes àquela necessária para o biótipo suscetível. Para a redução de 50% da MMSPA dos biótipos resistentes são necessárias doses 6 (Col) e 8 (Joi) vezes maiores do que as necessárias para o biótipo suscetível. A metabolização por inibição das P450 não é o mecanismo responsável pela resistência dos biótipos avaliados. A concentração de herbicida que reduz 50% da atividade da ALS do biótipo Col é semelhante ao Susc, no entanto, o biótipo Joi apresenta baixa inibição. Os herbicidas glifosato e cletodim apresentam-se como herbicidas alternativos para controle do biótipo resistente Col, resistente ao iodosulfurom, e o herbicida cletodim para o biótipo Joi. Na pré-emergência os herbicidas imazapir + imazapique, pendimentalina, clomazona, metribuzim, atrazina e S-metolachlor controlaram eficientemente os biótipos avaliados.

**Palavras-chave:** ALS, *Lolium multiflorum*, plantas daninhas, sulfonilureia

Mariani, Franciele; Leandro Vargas; Dirceu Agostinetto; Diego Severo Fraga; Fernando Machado dos Santos; Sandro Roberto Piesanti (2016) Ryegrass biotypes resistant to iodosulfuron methyl-sodium herbicide and herbicides alternatives to the control. Rev. Fac. Agron. Vol 115 (1): 35-43

Seeds biotypes suspected of resistance to iodosulfuron were collected in crops at Rio Grande do Sul (RS/Brazil) state aiming to identify the resistance level, metabolism, ALS enzyme activity and alternative herbicides to control. Was evaluated resistance level of resistant (Joi and Col) and susceptible biotypes with thirteen increasing rate of the herbicide iodosulfuron (0 to 384 g ai ha<sup>-1</sup>), sprayed in the vegetative stage of 3-4 leaves. Was assessed the metabolizing by the application of malathion, an inhibitor of P450 izoenzimas. Was evaluated the sensitivity of the ALS enzyme from different biotypes to iodosulfuron concentrations (0 to 500 mM) in laboratory. Were evaluated alternative herbicides to control of resistant ryegrass, belonging to different mechanisms of action in two trials (pre-emergence and post-emergent herbicides). According to results to equivalent control to the resistant biotypes are necessary iodosulfuron rates 10 (Col) and 8 (Joi) times higher that required to the susceptible biotype. To reduction of the MMSPA in 50% of resistant biotypes are required 6 (Col) and 8 (Joi) times higher rates than rate required for the susceptible biotype. The metabolism by inhibition of the P450 is not the mechanism responsible to the resistance in Col and Joi biotypes. The herbicide concentration that reduces 50% of ALS enzyme activity to Col biotype is similar to Susc, however, has little Joi biotype inhibition. The glyphosate and clethodim herbicides are shown as alternative to control the Col resistant biotype to iodosulfuron herbicide, and the clethodim herbicide to biotype Joi. Were efficiently controlled all biotypes evaluated with the herbicides imazapir + imazapic, pendimethalin, clomazone, metribuzin, atrazine and S-metolachlor in pre-emergency.

**Key words:** ALS, *Lolium multiflorum*, sulfonilurea, weed

Recibido: 11/02/2015

Aceptado: 03/02/2015

Disponibile on line: 01/07/2016

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

## INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma gramínea poacea anual, amplamente utilizada como forrageira em regiões temperadas e considerada planta daninha nas lavouras de trigo no Brasil. Desenvolve-se no outono, inverno e início da primavera, competindo, principalmente, com a cultura do trigo pelos recursos do meio, sobretudo devido às semelhanças entre as duas espécies (Radosevich et al., 1997). O controle químico do azevém é realizado basicamente com o herbicida iodosulfurom seletivo a cultura do trigo. A carência de herbicidas alternativos para o controle de azevém no trigo aumentou a pressão de seleção e propiciou o aumento dos casos de populações resistentes ao herbicida. A resistência é caracterizada como a habilidade adquirida da planta daninha em sobreviver e se reproduzir após submetida a dose herbicida a qual normalmente tem controle efetivo sobre a população (Vargas et al., 2009).

O iodosulfurom-metilico sódio pertence ao grupo químico das sulfonilureias e possui como mecanismo de ação a inibição da acetolactato sintase (ALS). Esse grupo de herbicidas age inibindo a enzima ALS, interrompendo a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Duggleby et al., 2008).

Biótipos de azevém resistentes a herbicidas foram identificados pela primeira vez em 1987, no Estado do Oregon, nos EUA, ao herbicida diclofop metílico cujo mecanismo de ação é a inibição da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase). No Brasil, o primeiro caso de resistência foi registrado em 2003, ao herbicida glifosato, inibidor da EPSPs. Aos inibidores da ALS os primeiros casos foram registrados em 1995, em Arkansas e Mississippi nos EUA, e mais tarde foram registrados casos de resistência no Chile (2002) e Idaho (2003), também nos EUA. No Rio Grande do Sul foram identificados biótipos de azevém resistente ao glifosato e mais recentemente a inibidores de ACCase e ALS (Heap, 2015).

A resistência pode ser atribuída a alteração do local de ação ou outro mecanismo que reduz a quantidade de herbicida ativo que chega até o local de ação do herbicida. A maioria dos casos de resistência aos inibidores da ALS ocorre devido à alteração do local de ação do herbicida (Tan et al., 2007; Yu et al., 2008; Kaloumenos et al., 2012; Kaundun et al., 2012). Nesse caso, a substituição de um aminoácido muda a conformação da enzima impedindo ou limitando a ligação do herbicida (Duggleby et al., 2008). Diante disso, a dose de herbicida necessária para inibir a atividade da enzima em biótipos resistentes é superior comparada aos biótipos suscetíveis, sendo a intensidade da inibição dependente do tipo de alteração que ocorre no gene (Yu et al., 2010).

Quando a resistência envolve a metabolização, as isoenzimas P450 são as principais responsáveis pela rápida degradação do herbicida. Em biótipos de *L. rigidum* a combinação de malation e sulfonilureia aumentaram a mortalidade das plantas resistentes ao herbicida (Christopher, et al., 1994). A utilização de inibidores da P450 pode ser a forma de avaliar a metabolização, pois inseticidas organofosforados, como o malation, inibem a enzima e reverterem a resistência (Yu et al., 2009).

Uma vez caracterizado o nível de resistência dos biótipos deve-se adotar medidas de controle que diminuam a evolução da resistência, dentre elas, a utilização de herbicidas com mecanismos distintos ao que a planta adquiriu resistência e, adoção de medidas de manejo que evitem o aparecimento de novos casos de resistência. Quando uma população apresenta resistência a apenas uma classe de herbicida, o sucesso no manejo da resistência pode ser alcançado com uso de herbicidas alternativos (Powles & Holtum, 1994). Desse modo, o uso de herbicidas com ação em pré e pós-emergência, com distintos mecanismos de ação, com potencial para controlar o azevém resistente e servir de opção de manejo, contribuem para reduzir a pressão de seleção.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o nível de resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurom, o metabolismo baseado na inibição das isoenzimas P450, analisar a sensibilidade *in vitro* da ALS e avaliar herbicidas alternativos para o controle desta espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nos anos de 2010 e 2011 foram realizadas coletas de 307 biótipos de azevém que sobreviveram a aplicações de iodosulfurom com suspeita de resistência, em 92 localidades no Estado do Rio Grande do Sul. As sementes coletadas foram semeadas em caixas e quando apresentavam de 2 a 3 folhas foi realizada a aplicação iodosulfurom na dose de 5 g i.a ha<sup>-1</sup>. Após 30 dias da aplicação do tratamento, as plantas foram avaliadas quanto à fitotoxicidade, adotando-se a escala percentual, onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte de plantas, respectivamente. Foram identificados 102 biótipos como resistentes (Silva, 2012), dos quais selecionou-se dois biótipo que apresentaram menor sensibilidade ao iodosulfurom, ou seja, maior grau de resistência, sendo oriundos das cidades de Jóia (Joi) 28° 38' 51"S e 54° 07' 21"O e Colorado (Col) 28° 28' 55"S e 53° 01' 13"O. O biótipo suscetível (Susc) foi coletado em área sem histórico de aplicação de herbicida 31° 48' 04"S e 52° 24' 50"O, localizado na cidade de Pelotas.

Para o experimento de dose resposta sementes dos biótipos foram semeadas em vasos com capacidade de 550 mL, preenchidos com substrato comercial Germina Plant<sup>®</sup> e arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Após a emergência realizou-se desbaste deixando-se uma planta por unidade experimental. Para determinar a dose que controla 50% da população (C<sub>50</sub>) e que reduz 50% da massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (MS<sub>50</sub>), foram realizadas aplicações de doses do herbicida iodosulfurom (Hussar<sup>®</sup>) sendo 0, 0,375, 0,75, 1,5, 3,0, 4,5, 12, 18, 24, 48, 96, 192 e 384 g i.a ha<sup>-1</sup>, aplicadas quando as plantas atingiram 2 a 3 folhas. Como adjuvante adicionou-se à calda de aplicação o espalhante adesivo Hoefix<sup>®</sup> na dose de 0,3% v/v. A aplicação dos tratamentos foi realizada com auxílio de pulverizador costal, pressurizado a CO<sub>2</sub>, equipado com bico do tipo leque com ponta de pulverização 110.015, calibrado para aplicar 150 L ha<sup>-1</sup> de calda herbicida.

As variáveis avaliadas foram controle visual e MMSPA. O controle foi avaliado aos 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), adotando-se a escala percentual, onde zero (0) e cem (100) corresponderam à ausência de dano e à morte de plantas, respectivamente. A MMSPA foi determinada após avaliação do controle pela secagem do material vegetal em estufa a temperatura de 60°C até atingir massa constante.

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em caso significativo, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear log-logístico e  $C_{50}$  e  $MS_{50}$  calculados a partir dos parâmetros da equação (Seefeldt et al., 1995). Os dados foram ajustados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico, conforme segue:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

onde:  $y$  = porcentagem de controle;  $x$  = dose do herbicida; e  $a$ ,  $x_0$  e  $b$  = parâmetros da equação, sendo que  $a$  é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva,  $x_0$  é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e  $b$  é a declividade da curva.

O fator de resistência (FR) foi calculado pela divisão do  $C_{50}$  ou  $MS_{50}$  do biótipo resistente pelos correspondentes ao do biótipo suscetível. O intervalo de confiança foi calculado através de estimação por intervalo para média  $\mu$  com variância estimada, conforme a equação:

$$P(\bar{x} - t_{\alpha/2} \sqrt{S^2/n} \leq \mu \leq \bar{x} + t_{\alpha/2} \sqrt{S^2/n}) = 1 - \alpha$$

onde,  $\bar{x}$  corresponde ao  $C_{50}$  ou  $FS_{50}$ ,  $t_{\alpha/2}$  valor da Tabela t de student,  $S^2$  o quadrado médio do erro do  $x_0$ , obtido na regressão não-linear e  $n$  o número de repetições (Storck et al., 2001).

O estudo para verificar se o mecanismo de resistência envolve a metabolização foi realizado com um inseticida organofosforado conhecido por inibir as izoenzimas P450, o malation. O experimento foi conduzido apenas com os biótipos resistentes (Col e Joi), sendo a instalação semelhante ao experimento de dose resposta, com três repetições, com e sem a aplicação do malation e 5 doses do herbicida iodosulfurom (0, 3, 6, 12 e 24 g i.a  $ha^{-1}$ ). O malation foi aplicado na dose de 1000 g i.a  $ha^{-1}$ , meia hora antes da aplicação do herbicida. Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Cada biótipo foi analisado separadamente. Em caso significativo, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear log-logístico.

Para a atividade *in vitro* da ALS, sementes dos biótipos foram semeadas em vasos com capacidade para 2 L, mantendo-se 12 plantas por vaso. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação até 3 a 4 folhas quando foram coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. O método de extração enzimática seguiu a metodologia proposta por Singh et al. (1988) com modificações. Para a reação foram

utilizados 400  $\mu$ L da solução enzimática, 500  $\mu$ L do tampão de reação e 100  $\mu$ L da solução herbicida. O tampão de reação foi preparado conforme metodologia proposta por Yu et al. (2010), com modificações. Para o preparo da solução herbicida, foram feitas diluições para as concentrações de trabalho desejadas a partir da solução estoque de 1000  $\mu$ M do padrão herbicida iodosulfurom-metilico Pestanal®. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L da solução herbicida para uma concentração final de 0, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 500  $\mu$ M. Após o preparo da reação, as amostras foram incubadas por 60 minutos a 34°C para a formação do acetolactato. Após a formação do complexo colorido a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 530 nm.

Os valores referentes à atividade da ALS foram padronizados pela concentração de proteína, quantificada pelo método Bradford e pela quantidade de acetoina produzida determinado pela curva padrão de acetoina.

Os valores de absorbância foram corrigidos por meio da subtração do valor do controle zero. Os valores obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Quando significativo, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não-linear exponencial conforme segue:

$$y = y_0 + ae^{-bx}$$

onde:  $y$  é a porcentagem de inibição da enzima;  $x$  a dose do herbicida;  $y_0$ ,  $a$  e  $b$  são parâmetros da equação. 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.

Para os experimentos com herbicidas alternativos em pré e pós-emergência foram utilizados vasos com capacidade de 550 mL, preenchidos com solo (Latossolo Vermelho Distrófico Típico) e substrato comercial Germina Plant®, respectivamente. Os tratamentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os herbicidas pós-emergentes foram aplicados conforme descrito no experimento de dose resposta e para os pré-emergentes as sementes foram semeadas (5 sementes vaso<sup>-1</sup>) e logo em sequência os herbicidas foram aplicados sobre o solo pré umedecido com água. Os tratamentos herbicidas avaliados em pós e pré-emergência constam na Tabela 1.

As variáveis avaliadas foram controle visual aos 21 e 28 DAT e MMSPA aos 28 DAT para o experimento com os herbicidas aplicados em pós-emergência, seguindo os mesmos procedimentos descritos no experimento de dose resposta. Para os herbicidas aplicados em pré-emergência os tratamentos foram avaliados aos 10 DAT por meio da contagem do número de plantas emergidas e aos 10 e 17 DAT avaliou-se o controle visual.

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em caso significativo, os biótipos e herbicidas foram comparados pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 1. Mecanismo de ação, grupo químico, ingrediente ativo, produto comercial e dose dos herbicidas utilizados nos tratamentos em pós e pré-emergência do azevém. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2011. \* Foi adicionado óleo mineral aos herbicidas Hussar (0,3% v/v), Aurora e Select (0,5% v/v).

	Mecanismo de ação	Grupo químico	Ing. Ativo	Produto comercial	Dose g i.a ha <sup>-1</sup>
Pós-emergência	Inib. de ALS	Sulfonilureia	Iodosulfurom-metilico	Hussar	3,5
	Inib. de protox	Triazolinona	Carfentrazona-etilica	Aurora	45,0
	Inib. de carotenoides	Isoxazolidinona	Clomazona	Gamit 360 CS	360,0
	Inib. da EPSPs	Glicina substituída	Glifosato	Glifosato Nortox	960,0
	Inib. de ALS	Imidazolinona	Imazetapir	Pivot	100,0
Pré-emergência	Inib. de ACCase	Ciclohexanodionas	Cletodim	Select 240 EC	96,0
	Inib. de ALS	Imidazolinona	Imazapir + Imazapique	Kifix	78,75 + 26,25
	Inib. de pol. da tubulina	Dinitroanilina	Pendimentalina	Herbadox	1.500
	Inib. de carotenoides	Isoxazolidinona	Clomazona	Gamit 360 CS	648
	Inib. do fotossistema II	Triazinona	Metribuzim	Sencor 480	480
	Inib. do fotossistema II	Triazina	Atrazina	Proof	2.250
	Inib. da sint. de ácido nuc. e prot.	Cloroacetamida	S-metolaclo	Dual Gold	1.920

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todas as variáveis no experimento de dose resposta verificou-se interação significativa entre os fatores dose e biótipo. Aos 14 DAT ambos os biótipos apresentaram controle insuficiente para calcular a dose necessária para o controle de 50% da população (dados não apresentados).

Aos 21 DAT observou-se necessidade de maior dose herbicida para controlar os biótipos resistentes em comparação ao Susc (Figura 1A). O C<sub>50</sub> observado foi de 19,80, 25,20 e 2,65 g i.a ha<sup>-1</sup> de iodosulfurom para os biótipos Col, Joi e Susc, respectivamente (Tabela 2). As doses para os biótipos resistentes diferiram do biótipo Susc e os fatores de resistência foram de 7,47 e 9,50 para o Col e Joi, respectivamente.

Aos 28 DAT o nível de controle novamente foi superior para o biótipo Susc, necessitando-se da dose de 1,93 g i.a ha<sup>-1</sup> para atingir o controle de 50%, sendo que para os resistentes, Col e Joi, as doses foram de 20,00 e 16,40 g i.a ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1B). Os fatores de resistência foram de 10,36 e 8,49 para o Col e Joi, respectivamente (Tabela 2). Considerando que a dose de registro do herbicida iodosulfurom para controle do azevém é de 3,50 g i.a. ha<sup>-1</sup>, ambos os biótipos resistentes apresentaram a dose do C<sub>50</sub> acima da recomendada, o que era esperado, pois na maioria dos casos a resistência aos inibidores da ALS é uma mutação na enzima (Yu et al., 2012), exigindo doses altas para controle das plantas resistentes (Beckie et al., 2012; Lamego et al., 2009). A explicação para níveis diferenciais de resistência pode estar relacionada com o aminoácido alterado na enzima ALS, que pode afetar em diferentes graus a afinidade da enzima com a molécula herbicida.

A avaliação da MMSPA aos 28 DAT confirmou os resultados do controle, sendo necessárias doses de 4,04, 4,80 e 0,61 g i.a ha<sup>-1</sup> para redução de 50% da

MMSPA nos biótipos Col, Joi e Susc, respectivamente (Figura 2; Tabela 2). Os fatores de resistência foram de 6,60 e 7,84 para os biótipos Col e Joi, respectivamente. Depois de confirmada a resistência dos biótipos ao iodosulfurom, investigou-se qual o mecanismo de resistência envolvido. Entre os principais mecanismos responsáveis pela resistência aos inibidores da ALS está a metabolização e alteração no local alvo de ação do herbicida (Kaundun et al., 2012; Yu et al., 2009). A metabolização utilizando o inibidor malation foi avaliada nos biótipos e os resultados demonstraram não ser esse o mecanismo responsável pela resistência (dados não apresentados) ou que não está envolvido com o mecanismo que o malation permite avaliar. Quando a resistência envolve a metabolização, as isoenzimas P450 são as principais responsáveis pela rápida degradação do herbicida. Em biótipos de *L. rigidum* a combinação de malation e uma sulfonilureia aumentaram a mortalidade das plantas resistentes ao herbicida (Christopher et al., 1994). Apesar do metabolismo baseado na P-450 ser o mais comum na detoxificação, estudos também tem demonstrado o papel da glutatona S-transferase como responsável pela resistência em alguns biótipos (Cummins et al., 2013).

Os ensaios *in vitro* com a ALS demonstraram que é necessária concentração de 0,0047 e 0,0055 µM do herbicida iodosulfurom para inibir 50% da atividade da enzima (I<sub>50</sub>) no biótipo Susc e Col, respectivamente (Figura 3). A inibição de 60% da atividade da enzima para o biótipo Joi foi obtida com concentração de 0,01 µM e a máxima inibição foi de 50% com a mais alta concentração do herbicida (500 µM) utilizada. Esses resultados confirmam a sensibilidade alterada da ALS para o biótipo Joi, no entanto, a inibição para o biótipo Col foi semelhante ao suscetível. Assim, o mecanismo de resistência do biótipo Col não decorre da insensibilidade da enzima ao herbicida e outro

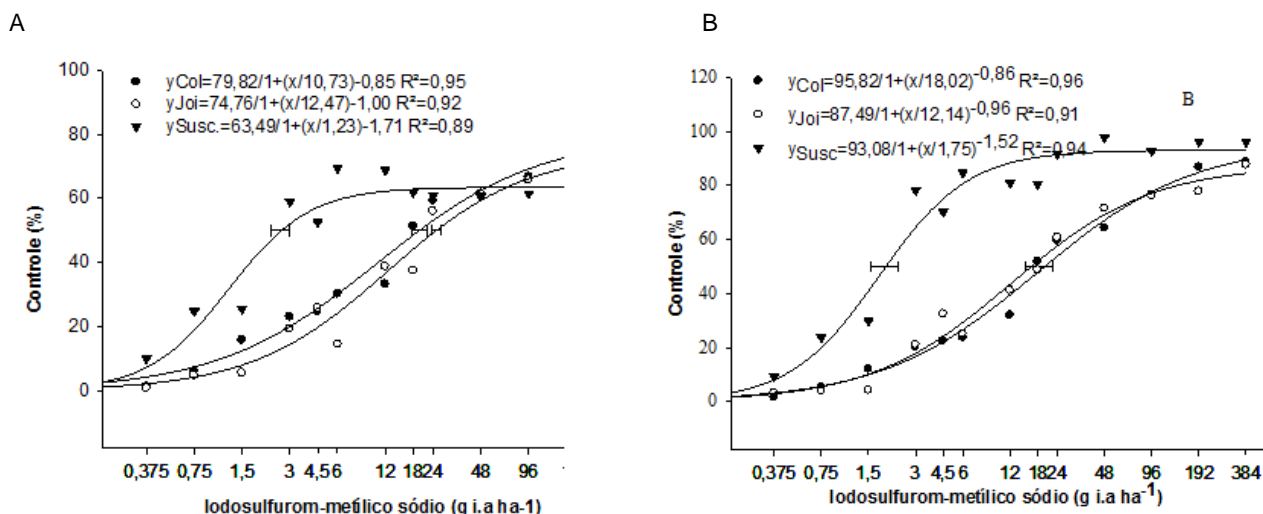


Figura 1. Controle visual (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metilico sódio, avaliado aos 21 (A) e 28 (B) dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.

Tabela 2. Valores de  $C_{50}$  e  $MS_{50}$  com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém, resistente (Col e Joi) e suscetível (Susc), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom, avaliado aos 21 e 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2011. <sup>1</sup> $C_{50}$  = dose necessária para obter 50% de controle; <sup>2</sup>Fator de resistência ao herbicida iodosulfurom-metilico sódio dos biótipos de azevém, obtido da divisão do  $C_{50}$  do biótipo resistente em relação ao biótipo suscetível. <sup>3</sup> $MS_{50}$  = dose necessária para obter 50% de redução da massa seca.

Biótipo	g i.a ha <sup>-1</sup>	95% IC	Fator de resistência <sup>2</sup>
<b>C<sub>50</sub><sup>1</sup></b>			
21 DAT			
Col	19,80	17,81-21,79	7,47
Joi	25,20	23,79-26,61	9,50
Susc	2,65	2,30-2,99	-
28 DAT			
Col	20,00	17,42-22,58	10,36
Joi	16,40	14,96-17,84	8,49
Susc	1,93	1,56-2,29	-
<b>MS<sub>50</sub><sup>3</sup></b>			
28 DAT			
Col	4,04	3,22-4,85	6,60
Joi	4,80	4,16-5,43	7,84
Susc	0,61	0,44-0,78	-

mecanismo que diminui a quantidade de herbicida ativo que chega na enzima alvo pode ser o responsável pela resistência. Considerando que o metabolismo alterado baseado nas isoenzimas P450 não é o responsável, o mecanismo pode ser devido a redução da absorção, translocação ou compartimentalização alterada, superprodução da ALS ou aumento da neutralização das moléculas citotóxicas geradas pela ação do herbicida (Délye et al., 2013).

Populações de *L. rigidum*, isoladas com diferentes tipos de substituição de aminoácido foram avaliadas quanto à atividade da enzima, observaram-se relações para o  $I_{50}$  entre resistente e suscetível (R/S) variando de 95 até >1333 vezes dependendo da localização e do tipo de aminoácido alterado (Yu et al., 2010). Ao serem avaliados os herbicidas alternativos em pós-emergência dos biótipos, o teste F, na análise de variância, demonstrou interação entre os fatores biótipo

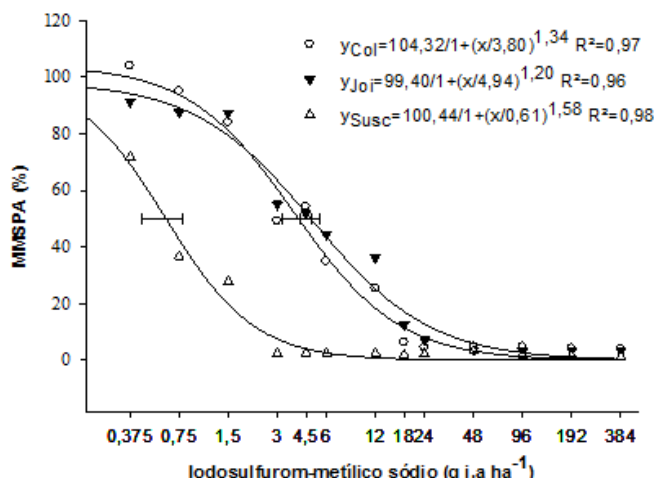


Figura 2. MMSPA (%) de biótipos de azevém, resistentes (Joi e Col) e suscetível (Susc), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metilico sódio, avaliado aos 28 dias após o tratamento. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2011. Os pontos representam os valores médios das quatro repetições e as barras horizontais os intervalos de confiança para a dose que causa 50% de controle na planta, com 95% de significância.

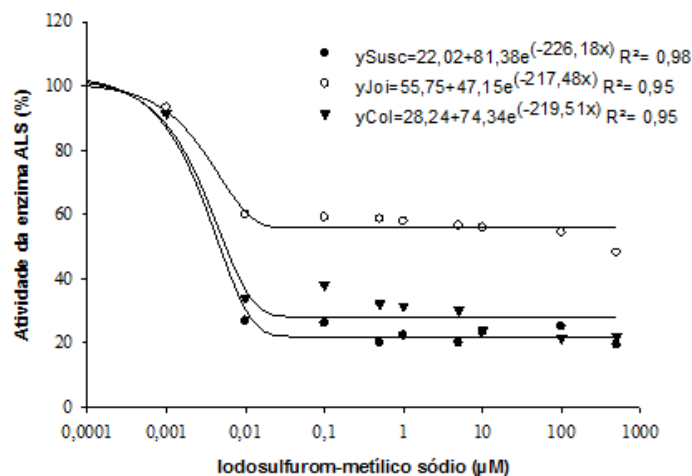


Figura 3. Inibição *in vitro* da atividade da enzima ALS em biótipo suscetível e dois resistentes pelo herbicida iodosulfurom-metilico sódio. Embrapa Trigo, 2013. Os pontos representam os valores médios das repetições e o ajuste da curva foi realizado com as três repetições.

e herbicida para todas as variáveis avaliadas. De acordo com os resultados aos 21 DAT o controle do biótipo Susc para o herbicida iodosulfurom não diferiu do resistente Col, sendo que os menores sintomas de fitotoxicidade foram observados para o biótipo Joi (Tabela 3). Aos 21 DAT os herbicidas carfentrazone e imazetapir proporcionaram o menor controle, entre os herbicidas avaliados, para ambos os biótipos resistentes e Susc. Entre os biótipos, o Susc apresentou menor controle com o imazetapir comparado aos biótipos resistentes. Isso indica uma provável resistência cruzada dos biótipos para as sulfonilureias e imidazolinonas. Quando a incidência de

resistência cruzada é alta dentro da população, isso pode levar à redução da eficácia de novos herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, até mesmo em situações comerciais quando são expostos pela primeira vez ao produto (Boutsalis et al., 2012).

Na avaliação de controle aos 28 DAT, para o herbicida iodosulfurom, o biótipo Susc apresentou nível de controle de 40 e 60% superior aos biótipos Joi e Col, respectivamente (Tabela 3). O herbicida imazetapir, cujo mecanismo de ação é a inibição da ALS, controlou eficientemente o biótipo Susc e apresentou controle insatisfatório dos biótipos resistentes, fato confirmado também na avaliação da MMSPA. O herbicida que

Tabela 3. Controle (%) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódico avaliado aos 21 e 28 dias após o tratamento (DAT) em pós-emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. \* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e antecedida de mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Tratamento	21 DAT			28 DAT			MMSPA		
	Col	Joi	Susc	Col	Joi	Susc	Col	Joi	Susc
Testemunha	<sup>ns</sup> 0 d	0 d	0 e	<sup>ns</sup> 0 d	0 d	0 e	<sup>ns</sup> 100 a	100 a	100 a
Iodosulfurom	AB 52 b	B 43 bc	A 68 b	B 43 b	B 28 c	A 73 bc	A 46 bc	A 52 bc	B 6 c
Carfentrazona	<sup>ns</sup> 28 c	33 c	41 d	B 9 cd	B 17 cd	A 38 d	B 36 c	A 58 b	B 30 b
Clomazona	C 47 b	A 65 a	B 55 c	B 44 b	B 49 b	A 59 c	<sup>ns</sup> 13 d	28 cd	14 c
Glifosato	A 76 a	B 55 ab	A 87 a	A 86 a	B 52 b	A 92 ab	B 7 d	A 29 cd	B 3 c
Imazetapir	B 20 c	B 25 c	A 50 cd	B 22 c	B 22 c	A 58 c	A 57 b	A 68 b	B 12 c
Cletodim	A 87 a	C 66 a	B 79 ab	A 90 a	B 84 a	A 94 a	B 4 d	A 7 d	B 5 c
CV (%)	17	23	10	18	22	14	14	25	26

proporcionou maior nível de controle, para os biótipos Col, Joi e Susc foi o cletodim além do glifosato para os biótipos Col e Susc. Ao ser avaliada a MMSPA os resultados indicaram eficiência como alternativa de controle aos biótipos resistentes os herbicidas glifosato, cletodim e clomazona (Tabela 3). Para o herbicida clomazona, quando considerado o controle aos 28 DAT, os percentuais ficaram abaixo de 50%, não consistindo em opção para o controle de azevém resistente. Resultado semelhante foi observado para o herbicida glifosato considerando o biótipo Joi, com controle de 52%, nesse caso, a menor sensibilidade ao herbicida faz com que este não seja uma boa opção de controle.

Considerando que existem populações de azevém resistentes ao herbicida glifosato no Rio Grande do Sul (Heap, 2015) esse biótipo pode ter certo nível de resistência ao glifosato.

Os herbicidas glifosato e cletodim apresentaram níveis de controle próximos de 90% e reduziram a MMSPA dos biótipos Col e Susc, sendo eficientes como alternativas de controle. Para o biótipo Joi apenas o cletodim foi o mais eficiente como alternativa. Dessa forma, o cletodim pode ser indicado para manejo de azevém resistente aos inibidores de ALS e o herbicida glifosato pode ser utilizado em população conhecida por ser suscetível ao mesmo. Considerando que há registro da resistência de azevém para glifosato e cletodim no Brasil (Heap, 2015), recomenda-se monitoramento constante da população e adoção de medidas adicionais de manejo, como rotação do uso de herbicida com diferente mecanismo de ação, eliminação de plantas suspeitas de resistência, entre outras, para evitar acúmulo de diferentes mecanismos de resistência em um mesmo biótipo.

Nas avaliações dos herbicidas pré-emergentes houve menor germinação ao ser utilizado o herbicida s-metalacoloro, seguido de pendimentalina e imazapir-imazapique, para os biótipos Col e Susc, sendo que para o biótipo Joi não houve diferença entre os tratamentos (dados não apresentados).

Controle satisfatório foi observado aos 10 dias após a semeadura para todos os herbicidas pré-emergentes, sendo confirmado com a morte de todas as plantas germinadas após 17 dias do tratamento (Tabela 4). Os herbicidas com ação residual clomazona, pendimentalina incorporada, S-metalacoloro, trifluralina incorporada e pyroxasulfone, proporcionaram controle superior a 94% do azevém resistente ao glifosato, até os 100 dias após a aplicação dos mesmos, no Mississippi (Bond et al., 2014). Considerando que pendimentalina e trifluralina não promovem controle satisfatório sem incorporação no solo, os demais herbicidas, quando aplicados no final do outono, passam ser opção para controlar a emergência do azevém, em algumas situações, até a primavera (Bond et al., 2014).

Em pós-emergência da cultura do trigo, as duas moléculas registradas para o controle do azevém pertencem aos inibidores de ALS (iodosulfurom) e ACCase (clodinafope), no entanto, como existem casos de resistência para ambos (Heap, 2015), as alternativas passam a ser os herbicidas pré-emergentes. Dessa forma, todos os herbicidas pré-emergentes estudados se apresentam como alternativas eficientes para controlar o azevém resistente ao iodosulfurom.

A utilização de múltiplos mecanismos de ação como tem sido relatado para diversas espécies de plantas daninhas é uma ferramenta importante para reduzir e manejar a evolução de plantas daninhas resistentes (Vencill et al., 2012). Além de diversificar os mecanismos de ação é importante utilizar herbicidas que são detoxificados por diferentes vias na planta (Délye et al., 2013).

## CONCLUSÕES

Os biótipos são resistentes ao herbicida iodosulfurom, sendo que o mecanismo de resistência desses biótipos não ocorre devido a metabolização baseada na inibição da isoenzima P450. A alteração do local de ação é o provável mecanismo de resistência para o biótipo Joi.

Tabela 4. Controle (%) de biótipos de azevém resistentes (Col e Joi) e suscetível (Susc) ao iodosulfurom-metílico sódico avaliado aos 10 e 17 dias após o tratamento (DAT), em pré-emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011. \* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e antecedida de mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ); ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Tratamento	10 DAT			17 DAT		
	Col	Joi	Susc	Col	Joi	Susc
Testemunha	<sup>ns</sup> 0 d	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
Imazapir + Imazapique	<sup>ns</sup> 83 b	83 a	77 a	90 a	90 a	100 a
Pendimentalina	<sup>ns</sup> 83 b	100 a	87 a	100 a	100 a	100 a
Clomazona	<sup>ns</sup> 98 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Metribuzim	<sup>ns</sup> 80 b	95 a	73 a	100 a	100 a	100 a
Atrazina	B 70 c	A 100 a	AB 89 a	97 a	100 a	97 a
S-metolacoloro	<sup>ns</sup> 98 a	100 a	98 a	100 a	100 a	100 a
CV (%)	5	7	16	5	4	3

Os herbicidas alternativos para o controle, em pós-emergência, são o glifosato e cletodim, para o biótipo Col e o herbicida cletodim para o biótipo Joi. Em pré-emergência os herbicidas imazapir + imazapique, pendimentalina, clomazona, metribuzim, atrazina e S-metolacoloro são opções eficientes para controle dos biótipos de azevém resistentes aos inibidores da ALS.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado.

#### REFERÊNCIAS

- Beckie, H.J., S.I. Warwick, C.A. Sauder, G.M. Kelln & C. Lozinski. 2012. Acetolactate Synthase Inhibitor-Resistant False Cleavers (*Galium spurium*) in Western Canada. *Weed Technology*, 26: 151-155.
- Bond, J.A., T.W. Eubank, R.C. Bond, B.R. Golden & H.M. Edwards. 2014. Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) Control with Fall-Applied Residual Herbicides. *Weed Technology*, 28: 361-370.
- Boutsalis, P., G.S. Gill & C. Preston. 2012. Incidence of Herbicide Resistance in Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) across Southeastern Australia. *Weed Technology*, 26: 391-398.
- Christopher, J.T., C. Preston & S.B. Powles. 1994. Malathion antagonizes metabolism-based chlorsulfuron resistance on *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 49: 172-182.
- Cummins, I., D.J. Wortley, F. Sabbadin, Z. He, C.R. Coxon, H.E. Straker, J.D. Sellars, K. Knight, L. Edwards, D. Hughes, S.S. Kaundun, S.J. Hutching, P.G. Steel & R. Edwards. 2013. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *PNAS*, 110: 5812-5817.
- Délye, C., M. Jasieniuk & V. Le Corre. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29: 1-10.
- Duggleby, R.G., J.A. Mccourt & L.W. Guddat. 2008. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 309-324.
- Heap, I. 2015. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org). Acesso em: 09 de fevereiro de 2015.
- Kaloumenos, S., V.C. Tsioni, E.G. Daliani, S.E. Papavassileiou, A.G. Vassileiou, P.N. Laoutidou & I.G. Eleftherohorinos. 2012. Multiple Pro-197 substitutions in the acetolactate synthase of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and their impact on chlorsulfuron activity and plant growth. *Crop Protection*, 38: 35-43.
- Kaundun, S.S., R.P. Dale & G.C. Bailly. 2012. Molecular basis of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in two rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations from Australia. *Weed Science*, 60: 172-178.
- Lamego, F.P., R.A. Vidal, N.R. Burgos & L.C. Federizzi. 2009. Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. *Weed Science*, 57: 474-481.
- Powles, S. & J. Holtum. 1994. Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry. New York, CRC Press. 353p.
- Radosevich, S., J. Holt & C. Ghersa. 1997. *Weed ecology: implications for vegetation management*. New York, Wiley. 589 p.
- Seefeldt, S.S., J.E. Jensen & E.P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 9: 218-227.
- Singh, B.K., M.A. Stidham & D.L. Shaner. 1988. Assay of acetohydroxyacid synthase. *Analytical Biochemistry*, 171: 173-179.
- Silva, J.M.B.V. Da. 2012. Avaliação da distribuição geográfica de biótipos de azevém anual resistente a herbicidas no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 37 p.
- Storck, L., S.J. Lopes & A.D. Lúcio. 2001. Introdução à Experimentação. Santa Maria, Departamento de Fitotecnia/UFSM. 54p.
- Tan, M.K., C. Preston & G.X. Wang. 2007. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and



ALS inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. Weed Research, 47: 534–541.

**Vargas, L., A.A. da Silva, D. Agostinetto & D.Gazziero.** 2009. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: Agostinetto R & Vargas L (Eds). Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Passo Fundo, Gráfica Berthier. p. 9-36.

**Vencill, W.K., R.L. Nichols, T.M. Webster, J.K. Soteres, C. Mallory-Smith, N.R. Burgos, W.G. Johnson & M.R. McClelland.** 2012. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide resistant crops. Weed Science, 60: 2-30.

**Yu, Q., H. Han, M. Li, E. Purba, M.J. Walsh & S.B. Powles.** 2012. Resistance evaluation for herbicide resistance – endowing acetolactate synthase (ALS)

gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. Weed research, 52: 178-186.

**Yu, Q., H. Han, L. Nguyen, J.W. Forster & S.B. Powles.** 2009. Paraquat resistance in a *Lolium rigidum* population is governed by one major nuclear gene. Theoretical & Applied Genetics, 118: 1601-1608.

**Yu, Q., H. Han & S.B. Powles.** 2008. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. Pest Management Science, 64: 1229–1236.

**Yu, Q., H. Han & M.M. Vila-Aiub.** 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. Journal of Experimental Botany. 61: 3925–39.