

**ATIVIDADE DA ENZIMA ALS DE BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L.
COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS INIBIDORES DA ALS E PROTOX**

XAVIER, E. (PPGAG – UTFPR, Pato Branco/PR - elo231@hotmail.com), TREZZI, M. M. (UTFPR, Pato Branco/PR - trezzim@gmail.com), OLIVEIRA, M. C. (UTFPR, Pato Branco/PR - marisa_olive@yahoo.com.br), DIESEL, F. (PPGAG – UTFPR, Pato Branco/PR – francielli_diesel@hotmail.com), BORSATTI, F. C. (UTFPR, Pato Branco/PR - flacborsatti@hotmail.com), PAZUCH, D. (PPGAG – UTFPR, Pato Branco/PR – daianapazuch@yahoo.com.br)

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi determinar a resposta da enzima ALS aos herbicidas imazapyr e imazethapyr, em biótipos de leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) com resistência múltipla. O experimento ocorreu em laboratório e consistiu de ensaio *in vitro* da enzima acetolactato sintase (ALS) em biótipos de *Euphorbia heterophylla*. Utilizou-se, para este trabalho, os herbicidas inibidores da ALS imazapyr e imazethapyr para o ensaio da atividade relativa da enzima e os biótipos oriundos de Vitorino (PR) e Bom Sucesso do Sul (PR) (com resistência múltipla a inibidores da ALS e Protox) e São Paulo (suscetível). A enzima ALS do biótipo São Paulo apresentou $V_{\text{máx}}$ de 0,26 U/mg na maior dose testada de piruvato, de 0,45 U/mg para o biótipo Vitorino e para Bom Sucesso do Sul foi de 0,49 U/mg na maior dose testada. Isto demonstra que a resistência não afetou a afinidade da enzima pelo substrato. Os resultados encontrados com o estudo da atividade relativa da enzima ALS pelos herbicidas imazapyr e imazethapyr evidenciam o efeito reduzido dos inibidores da ALS sobre sua atividade em biótipos R e, em contrapartida, alto efeito inibitório para o biótipo S. Os FR's observados para os herbicidas testados foram superiores a 295 e 903 para os biótipos Vitorino e Bom sucesso do Sul, respectivamente. Concluiu-se que a resistência observada a campo deve-se a insensibilidade da enzima ALS aos herbicidas inibidores da ALS estudados.

Palavras-chave: acetolactato sintase, herbicidas, leiteiro.

INTRODUÇÃO

O leiteiro ou amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*) (EPHHL) é uma planta daninha que causa grande preocupação pela sua alta capacidade e habilidade competitiva com as culturas de lavoura (CHEMALE & FLECK, 1982).

Os primeiros casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas, detectados no Brasil têm como causa mais provável o uso frequente de herbicidas inibidores da acetolactato sintase - EC 2.2.1.6 (ALS) (VARGAS, 2000). Suspeita-se que em biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da Protox, detectados na região Sudoeste do Paraná, 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, provavelmente, resultou em resistência aos dois mecanismos de ação, em momentos distintos, na mesma população. No entanto, estes biótipos ainda não tiveram seu mecanismo de resistência elucidado.

A análise e identificação do mecanismo de resistência pode ser uma grande ferramenta para um manejo mais eficiente desta espécie, podendo proporcionar, primeiramente, melhor prevenção de ocorrências de casos de resistência e também para melhor controle dos casos já existentes.

O objetivo deste trabalho foi determinar a resposta da enzima ALS aos herbicidas imazapyr e imazethapyr, em biótipos de leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) com resistência múltipla.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. Foram utilizados biótipos de *Euphorbia heterophylla* (EPHHL) oriundos de Bom Sucesso do Sul (PR) e Vitorino (PR) (com resistência múltipla a inibidores da ALS e Protox) e São Paulo (SP) (suscetível).

A extração da enzima ALS ocorreu com maceração do material vegetal de EPHHL congelado em nitrogênio líquido, com 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), 0,0576 g de tiamina pirofosfato (TPP) (1,25 mM), 0,207 mg de flavina adenina dinucleotídeos (FAD, 2,5 µM). No processo de maceração foi adicionado polivinilpolipirrolidona (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.

Para o ensaio *in vitro* da ALS, em tubos de ensaio, adicionou-se 500 µL de água (para os controles positivos – 100% da atividade da ALS) ou 500 µL de solução herbicida, acrescentando-se 250 µL de H₂SO₄ 1,8 N aos controles denominados negativos com (0% de atividade da enzima ALS). Em seguida, foram adicionados 500 µL de extrato enzimático nos tubos, os quais foram incubados por um período de 120 min a 37 °C. Decorrido este tempo, as reações foram interrompidas com 250 µL de H₂SO₄ 1,8 N, exceto nos controles negativo. Todos os tratamentos constaram de três repetições. Em seguida, iniciou-se a segunda incubação por 15 min a 60 °C. Depois, adicionaram-se 700 µL de uma solução de hidróxido de sódio 2 N contendo creatinina a 0,25% e naftol a 2,5%. Após, os tubos foram novamente incubados por 15 min a 60 °C. Posteriormente, foram obtidas as absorbâncias através de leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 535 nm.

Foram preparadas soluções aquosas dos herbicidas imazethapyr e imazapyr para o ensaio *in vitro* 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 o ensaio de atividade enzimática utilizou-se diferentes concentrações de 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 o ensaio realizado sem presença do inibidor. Os valores de atividade da ALS foram expressos em unidade enzimática por miligrama (U/mg), em que uma unidade da acetolactato sintase foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 0,1 unidade de absorbância 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 quatro parâmetros e, no caso onde não houve ajustamento a este modelo, priorizando-se, em ordem decrescente, o modelo logístico de três parâmetros e os sigmoidais, de quatro e três parâmetros. 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da enzima ALS apresentou grande variação entre os biótipos testados (Figura 1). A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da atividade da enzima ALS observada no biótipo S foi de 0,26 U/mg com a concentração de 160 mM de piruvato. Para o biótipo Vitorino obteve-se 0,45 U/mg e para Bom Sucesso do Sul 0,49 U/mg isto com a concentração máxima de 60 mM de piruvato (Figura 1).

Com base nestes resultados, levanta-se a hipótese de que a possível mutação de resistência provocou alteração na enzima ALS que não modificou de maneira significativa a sua afinidade pelo substrato. E também a eficiência de conversão do piruvato não foi afetada uma vez que o $V_{m\acute{a}x}$ da enzima dos biótipos R foi maior que o da enzima do biótipo S.

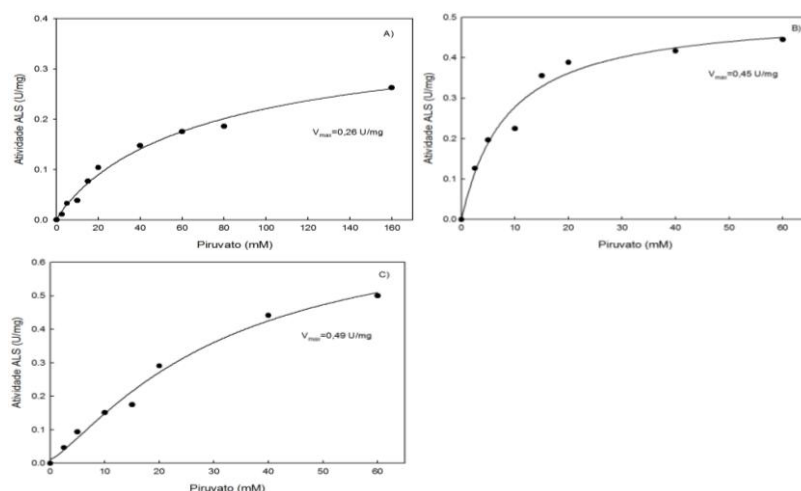


Figura 1. Atividade da enzima acetolactato sintase de biótipo Suscetível (A) e resistentes, Vitorino (B), Bom Sucesso do Sul (C) de *E. heterophylla* L., em função das diferentes concentrações de piruvato.

Entretanto, nos estudos da atividade relativa da enzima (%), ou seja, a atividade enzimática com a adição dos herbicidas inibidores da ALS (imazapyr e imazethapyr), constatou-se que a enzima do biótipo S teve sua atividade altamente inibida por ambos os herbicidas, sendo que com a maior dosagem utilizada (8 μ M de herbicida) houve uma redução da atividade da ALS de 86% para o imazethapyr e 80% para o imazapyr (Figura 2 A). O biótipo Vitorino com a maior dosagem utilizada (3000 μ M de herbicida) reduziu a atividade da enzima de 42% para o herbicida imazethapyr e 45% para o imazapyr (Figura 2 B). E o biótipo Bom Sucesso com a maior dosagem

utilizada (3000 μM de herbicida) houve uma redução da atividade da enzima de 31% para o herbicida imazethapyr e 42% para o imazapyr (Figura 2 C).

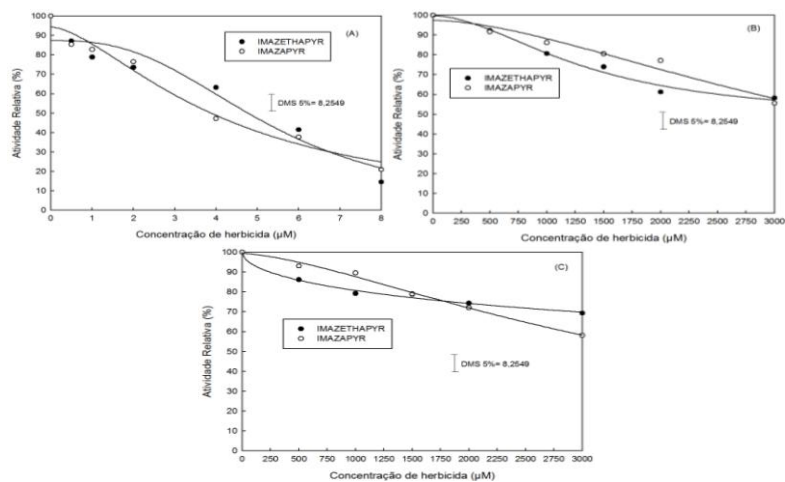


Figura 2. Atividade relativa da enzima acetolactato sintase de biótipos de *E. heterophylla* L. suscetível (A), e resistentes, Vitorino (B) e Bom Sucesso do Sul (C), em função das doses crescentes dos herbicidas imazethapyr e imazapyr.

A atividade da ALS variou entre os biótipos testados, e os herbicidas imazapyr e imazethapyr apresentam alto efeito inibitório sobre esta enzima do biótipo S e baixo efeito inibitório sobre a enzima dos biótipos R (Figura 2). A enzima do biótipo Bom Sucesso do Sul foi a menos sensível, seguida por Vitorino.

Os biótipos possuem grandes diferenças de I_{50} para esses herbicidas (Tabela 1), que podem ser atribuídas a variações intrínsecas da ALS, e as diferenças na estabilidade da enzima (STIDHAM & SINGH, 1991).

O maior FR observado para o biótipo Vitorino foi de 899,9 para o herbicida imazapyr. E para o biótipo Bom Sucesso do Sul foi de 3051,7 para o herbicida imazethapyr. Isto demonstra alta resistência nesses biótipos aos herbicidas inibidores da ALS, imazapyr e imazethapyr.

Tabela 1. Níveis de Imazethapyr e Imazapyr, necessários para reduzir em 50% a atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) (I_{50}) dos biótipos resistentes e suscetível de *E. heterophylla*, e os fatores de resistência (FR).

Valores de I_{50} *						FR**			
Resistentes				Suscetível		Resistentes			
Vitorino	Bom Sucesso do Sul					Vitorino	Bom Sucesso do Sul		
Imazethapyr	Imazapyr	Imazethapyr	Imazapyr	Imazethapyr	Imazapyr	Imazethapyr	Imazapyr	Imazethapyr	Imazapyr
1359,9 ¹	3761,5 ²	14037,8 ¹	3774,9 ²	4,6 ³	4,18 ²	295,6	899,9	3051,7	903,1

* Nível de herbicida que produz 50% de controle (I_{50}); ** $FR = I_{50} \text{ resistente} / I_{50} \text{ suscetível}$. ^{1/} Modelo logístico de quatro parâmetros. ^{2/} Modelo logístico de três parâmetros. ^{3/} Modelo sigmoidal de quatro parâmetros.

CONCLUSÕES

A resistência dos biótipos de *E. heterophylla* testados aos herbicidas inibidores da ALS é atribuída a menor sensibilidade desta enzima a estes herbicidas. Não houve mudança na afinidade da enzima ALS pelo substrato, originada pela resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p.248-254. 1976.
- CHEMALE, V.M. & FLECK, N.G. Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) em competição com *Euphorbia heterophylla* L. sob três densidades e dois períodos de ocorrência. **Planta Daninha**, Campinas, v.5, p. 36-45, 1982.
- 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.
- TREZZI, M. M. et al. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. B40, n. 1, p. 1-9, 2005.
- VARGAS, L. D. S. **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.