

Extravasamento eletrolítico em discos foliares de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla e suscetível, incubados com fomesafen e flumiclorac

Michelangelo Muzell Trezzi¹; Mara Stoco Gustmann¹; Edson Franchin¹; Rafael Pedroso da Silva¹; Edemir Miotto Jr.¹; Felipe Pattel¹; Anderson Luis Nunes¹; Emerson da Silva Portes¹; Ribas Antonio Vidal²; Nelson Diehl Kruse³;

¹ UTFPR – Curso de Agronomia – Via do Conhecimento, km 01, Caixa Postal 571, 85503-390, Pato Branco (PR); ² UFRGS – Faculdade de Agronomia – Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre (RS); ³ UFSM – Centro de Ciências Agrárias – Bairro Camobi, Santa Maria (RS).

RESUMO- Dois experimentos foram realizados para determinar se há diferenças no extravasamento eletrolítico entre biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla e suscetível, incubados em meio contendo inibidores da PROTOX. Discos foliares de *E. heterophylla* foram incubados em placas de petri, em meio contendo os herbicidas fomesafen (primeiro experimento) e flumiclorac (segundo experimento). Os ensaios conduzidos em delineamento completamente casualizado com três repetições, organizado em fatorial 2 x 9, representados pelos biótipos (S e R a PROTOX) e pelas concentrações dos herbicidas (20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2560 micromolar). No tratamento testemunha sem herbicida, o biótipo suscetível apresentou extravasamento eletrolítico superior ao resistente. No entanto, as diferenças de extravasamento entre os biótipos não aumentaram com a utilização dos herbicidas fomesafen e flumiclorac, indicando que o extravasamento superior é inerente ao biótipo suscetível e não é devido ao estresse oxidativo gerado pela presença dos inibidores da PROTOX.

Palavras-chave: estresse oxidativo, condutividade elétrica, inibidores da PROTOX.

ABSTRACT - Electrolytic leakage in foliar disks of *Euphorbia heterophylla* biotypes with multiple resistance and susceptible, incubated with fomesafen and flumiclorac

Two trials was carried to verify if there are differences in electrolyte leakage between susceptible and multiple resistant *E. heterophylla* biotypes, incubated with solution containing PROTOX inhibitors. *E. heterophylla* foliar disks were incubated in petri dishes with a médium containing fomesafen (first trial) and flumiclorac (second trial). The trials were completely randomized design with three repetitions, organized in a factorial 2 (biotypes) x 9 (herbicide concentrations - 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2560 micromoles). In the test without herbicide, the susceptible biotype showed bigger electrolyte leakage than the resistant. However, the differences of electrolyte leakage between susceptible and resistant biotypes didn't increase with the utilization of fomesafen or flumiclorac. These results indicate that the electrolyte leakage superior is inerent to the

susceptible biotype and is not due to oxidative stress generated by PROTOX inhibitors presence.

Key-words: oxidative stress, electrolytic conductivity, PROTOX inhibitors.

INTRODUÇÃO

Recentemente, em 2004, em áreas cultivadas com soja localizadas na região sudoeste do Paraná, foram identificados dois biótipos de *E. heterophylla* que não respondiam à aplicação das doses recomendadas dos herbicidas imazethapyr (inibidor da ALS) e fomesafen (inibidor da PROTOX) para o controle dessa espécie (Trezzi et al., 2005). Essas áreas apresentavam histórico de aplicação por vários anos de herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX. Herbicidas inibidores da PROTOX, como os dos grupos dos difeniléteres, ftalamidas, triazolinonas e oxadiazols inibem a última enzima comum às rotas de biossíntese de compostos heme e de clorofila, nos cloroplastos (Duke et al, 1991). Os herbicidas desses grupos induzem à acumulação de protoporfirinogênio, que difunde ao citoplasma, onde é oxidado a protoporfirina IX (Jacobs et al., 1991). Protoporfirina IX induz à formação de radicais livres, responsáveis pela destruição da membrana plasmática e da clorofila (Lydon & Duke, 1988). O dano causado às células pelos radicais livres pode ser medida pelo aumento da condutividade eletrolítica de uma solução em que o tecido tratado é submergido, isto é, incubado (Vanstone & Stobbe, 1977; Yanase et al., 1990; Koo et al., 1994). Essa metodologia foi testada por Li et al. (2000) para discriminar cultivares de soja com maior tolerância ao herbicida sulfentrazone. Até o presente momento desconhece-se o comportamento da condutividade eletrolítica em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e resistente a inibidores da PROTOX, o que seria importante para a detecção mais rápida de diferenças entre os biótipos. Esta também seria uma ferramenta auxiliar na definição do mecanismo de resistência a inibidores da PROTOX nessa espécie.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o extravasamento eletrolítico em biótipos de *E. heterophylla* resistente e suscetível a inibidores da PROTOX, através do método da imersão de discos foliares em soluções contendo fomesafen e flumiclorac.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada foi adaptada do trabalho de Li et al. (2000), também utilizada por Kruse et al. (2006). Dois experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado, com três repetições, arranjos em fatorial 2x9. Em ambos experimentos, o primeiro fator foi composto pelos dois biótipos de *E. heterophylla* (com resistência simultânea a ALS e PROTOX e suscetível); o segundo fator pelos 9 níveis de

cada herbicida (fomesafen no primeiro experimento e flumiclorac no segundo). Plantas do biótipo com resistência simultânea e do biótipo suscetível foram cultivadas em casa de vegetação do Curso de Agronomia da UTFPR, Campus Pato Branco. A semeadura dos biótipos foi realizada em 15 de janeiro de 2007. Quando as plantas atingiram duas folhas verdadeiras, foram retirados 40 discos foliares com 5 mm de diâmetro para cada repetição, para realizar os testes de condutividade eletrolítica. Os discos foliares foram imersos em 5 mL de solução de incubação, em placas de petri com 9 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura. A solução de incubação foi composta por água destilada com 1% (p.v⁻¹) de sacarose e 1 mM do tampão (MES NaOH {2-(*N*-morfolino) ácido etanosulfônico}), pH 6,5. A esta solução de incubação foi adicionado 0,5 mL de solução contendo herbicida. Foram utilizadas nove concentrações de cada herbicida (20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2560 micromolar) para cada biótipo. Juntamente com as doses de herbicidas adicionou-se a cada tratamento uma solução de incubação. Os discos foliares foram então incubados por 24 horas na ausência de luz e por 36 horas sob presença de luz, a temperatura de 24 ± 0,5°C. Após os períodos de incubação, as soluções com e sem os discos e com os herbicidas foram colocadas em tubos de ensaio e medida a condutividade eletrolítica por condutímetro com eletrodo de platina e expressa em $\mu\text{mho}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Foi analisada a significância dos fatores principais e da interação entre fatores. A relação entre condutividade elétrica e os níveis dos herbicidas foi ajustada através de equação logística de quatro parâmetros, com auxílio do programa Sigmaplot (Seefeld et al., 1995). Para comparações dos dados entre biótipos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extravasamento eletrolítico da solução no biótipo de *E. heterophylla* suscetível foi inferior à do biótipo resistente a inibidores da PROTOX. No entanto, a diferença entre elas não foi devido à presença do herbicida (Figuras 1 e 2), pois a testemunha sem fomesafen (concentração zero) apresentou diferenças entre os biótipos S e R similares às obtidas com diferentes níveis de fomesafen (Figura 1). Também houve diferença de condutividade entre os biótipos suscetível e resistente na ausência de flumiclorac, que foi reduzida com a presença desse herbicida (Figura 2). Esses resultados indicam que o extravasamento eletrolítico superior no biótipo suscetível de *E. heterophylla*, em relação aos resistente, é uma característica inerente a esse biótipo, verificada na ausência dos herbicidas. As diferenças de liberação de eletrólitos entre os biótipos suscetível e resistente, causadas por estresse oxidativo e o conseqüente extravasamento do conteúdo celular, não são

aumentadas com a adição dos herbicidas fomesafen e flumiclorac. Esse efeito é observado ao analisar-se os valores de I_{50} (Figuras 1 e 2). Em função de que os dados de controle dos herbicidas inibidores da PROTOX aplicados na parte aérea das plantas demonstram fatores de resistência (FR's) entre 39 e 62 (Trezzi et al., 2005), esperava-se valores de I_{50} de condutividade eletrolítica superiores no biótipo R, em relação ao S, o que no entanto não foi obtido. Curvas de dose resposta em pré e pós-emergência, demonstraram controles significativamente superiores do biótipo S em relação ao R a PROTOX apenas na aplicação em pós-emergência (dados não mostrados). A interpretação desses resultados em conjunto, permite inferir que a metodologia de incubação, que emprega discos foliares, rompe barreiras à penetração do herbicida. Dessa forma, pode-se justificar a ausência de diferenças de estresse oxidativo entre os biótipos S e R pelo uso de fomesafen e flumiclorac. Quando os herbicidas são empregados em pós-emergência, as barreiras à sua penetração estão intactas, o que resulta na maximização da diferença entre os biótipos. Os resultados descrevem, através da metodologia de incubação de discos foliares, ausência de estresse oxidativo diferencial entre os biótipos de *E. heterophylla* resistente e suscetível a inibidores da PROTOX causada pela presença de fomesafen e flumiclorac.

LITERATURA CITADA

DUKE, S.O. et al. Prooporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 39, p. 465-473, 1991.

JACOBS, J.M. et al. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. **Plant Physiology**, v. 97, p. 197-203, 1991.

KOO, S.J. et al. Quinclorac-induced electrolyte leakage in seedling grasses. **Weed Science**, v. 42, p. 1-7, 1994.

KRUSE, N.D. et al. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v. 24, p. 379-390, 2006.

LI, Z. et al. Using electrolyte leakage to detect soybean (*Glycine max*) cultivars sensitive to sulfentrazone. **Weed Technology**, v. 14, p. 699-704, 2000.

LYDON, J.; DUKE, S.O. Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the p-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 31, p. 74-83, 1988.

SEEFELDT, S.S. et al. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v. 9, p. 218-225, 1995.

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. 40, p. 101-109, 2005.

VANSTONE, D.E.; STOBBE, H. Root uptake, translocation, and metabolism of nitrofluorfen and oxyfluorfen by fababeans (*Vicia faba*) and green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Science**. V. 26, p. 389-392, 1978.

YANASE, D.A. et al. A new simple bioassay to evaluate photosynthetic electron-transport inhibition utilizing paraquat phytotoxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 35, p. 92-98, 1990.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à Fundação Araucária, pelo apoio a este trabalho.

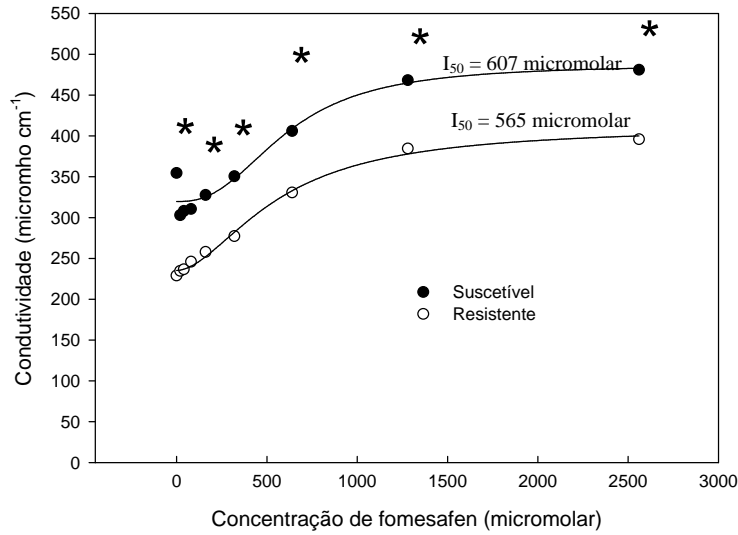


Figura 1 - Efeito de concentrações de fomesafen sobre a conduividade eletrolítica de discos foliares de *E. heterophylla* suscetível e resistente a inibidores da PROTOX.
 * Indicam diferenças entre biótipos significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

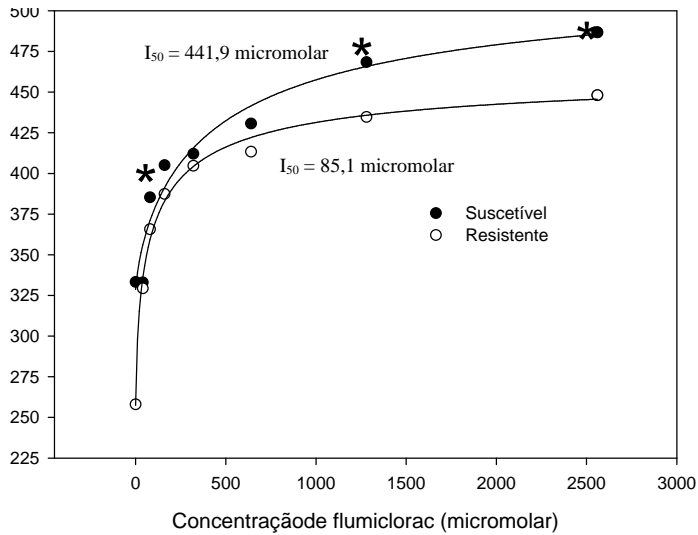


Figura 2 - Efeito de concentrações de flumiclorac sobre a conduividade eletrolítica de discos foliares de *E. heterophylla* suscetível e resistente a inibidores da PROTOX.
 * Indicam diferenças entre biótipos significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância