

## RESISTÊNCIA DE NOVOS BIÓTIPOS DE AZEVÉM A GLYPHOSATE EM LAVOURAS ANUAIS DO RIO GRANDE DO SUL

COSTA, F. R. (CAV/UDESC – Lages/SC – flav\_regina@hotmail.com), ANSOLIN, H. H. (CAV/UDESC – Lages/SC – humbertoansolin@yahoo.com.br), STINGHEN, J. C. (CAV/UDESC – Lages/SC – jcstinghen@hotmail.com), GMACH, J. R. (UDESC – Lages/SC – jr.gmach@yahoo.com.br), CARVALHO, L. B. (CAV/UDESC – Lages/SC – leonardo.carvalho@udesc.br), COELHO, C. M. M. (CAV/UDESC – Lages/SC – cileide.coelho@udesc.br)

**RESUMO** – O objetivo foi testar biótipos novos de azevém (*Lolium multiflorum*), provenientes de lavouras anuais de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate. Plantas de quatro biótipos (S1 e S2, de SC, e R1 e R2, do RS), apresentando de 4 a 6 folhas totalmente expandidas foram expostas a doses crescentes de glyphosate, variando de 0 a 1.440 g e.a. ha<sup>-1</sup>, sendo obtida sua massa fresca acumulada após 21 dias. A dose requerida para reduzir a massa fresca em 50% foi de 35, 52, 104 e 290 g e.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente para os biótipos S1, S2, R1 e R2. Os biótipos S2, R1 e R2 toleraram doses 1,5, 3,0 e 8,3 vezes maiores que S1. Os biótipos R1 e R2 são resistentes ao glyphosate, sendo que R2 é mais resistente que R1.

**Palavras-chave:** *Lolium multiflorum*, N-(fosfonometil)-glicina, Dose-resposta.

### INTRODUÇÃO

A resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) a glyphosate (inibidor de EPSPS – 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) não é novidade, mas a identificação de novos bióticos, em áreas onde ainda não haviam sido detectados, indica que o problema está longe de ser resolvido, pelo contrário, evidencia o seu aumento. No Brasil, o primeiro caso de azevém resistente a glyphosate ocorreu em 2003, no Rio Grande do Sul, em lavouras de soja e pomares (HEAP, 2014). Em 2010, a situação passou a ser mais crítica, com identificação de resistência múltipla a glyphosate e clethodim (inibidor de ACCase – acetil-coenzima-a carboxilase) em lavouras de trigo, milho e soja, no Rio Grande do Sul. Atualmente, há evidência existência de biótipos de azevém resistentes também a inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). Portanto, a importância da resistência de azevém a herbicidas é indiscutível, por isso é necessário a identificação e o monitoramento de novas populações resistentes para que ações mitigatórias sejam tomadas para se evitar sua dispersão.

O objetivo com essa pesquisa foi testar três biótipos novos de azevém, provenientes de populações infestantes de lavouras anuais de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com suspeita de resistência a glyphosate.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de azevém foram coletadas em três lavouras anuais localizadas nos municípios de Ponte Serrada (S2), em SC, Passo Fundo (R1) e Vacaria (R2), no RS, com suspeita de resistência a glyphosate. Além disso, também foram coletadas sementes em área urbana de Lages (S1), em SC, sem histórico de aplicação de herbicidas. Essas sementes foram semeadas em copos plásticos de 300 mL preenchidos com substrato comercial. As plantas cresceram em câmara de crescimento (fitotron), com condições controladas de temperatura de 25 °C, umidade de 60% e fotoperíodo de 14h:10h (luz:escuro) estabelecido por lâmpadas incandescentes com fluxo luminoso de 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O herbicida glyphosate foi aplicado em doses de 0, 5,625, 11,25, 22,5, 45, 90, 180, 360, 720 e 1.440 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ , diretamente sobre plantas de todos os biótipos quando apresentaram 4-6 folhas. Foi utilizado pulverizador costal pressurizado a  $\text{CO}_2$ , com pressão de 200 kPa, munido de barra de pulverização contendo quatro pontas tipo leque TeeJet 80.02 VS e calibrado para volume de calda de 200 L  $\text{ha}^{-1}$ . O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições.

Aos 21 dias após a aplicação do herbicida, as plantas foram cortadas rente ao substrato. O material foi pesado em balança analítica (0,00001 g) para determinação da massa fresca.

Os dados foram submetidos à análise de regressão segundo o modelo não-linear, log-logístico:

$$y = \text{min} + (\text{max} - \text{min}) / [1 + (x^{\text{Hillslope}}/\text{EC50})]$$

em que: y indica massa fresca; min e max são coeficientes que expressam os valores mínimo e máximo de massa fresca; Hillslope é a inclinação da curva; EC50 é o ponto de inflexão da curva (expressa a dose requerida para reduzir a massa fresca em 50% – EC50); e x representa a dose de produto comercial usada.

A análise estatística do experimento foi realizada através do programa computacional SigmaPlot® (Systat, versão 10.0, EUA). Adicionalmente, este programa utiliza o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos resíduos e a correlação de Spearman Rank entre valores absolutos e dos resíduos e absolutos das variáveis dependentes para testar a homogeneidade de variâncias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro biótipos testados apresentaram resposta diferencial ao aumento de dose do herbicida glyphosate (Figura 1). Os biótipos S1 e S2 acumularam menor quantidade de massa fresca em doses de até 180 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ ; já em doses de glyphosate acima de 360 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ , os biótipos S1, S2 e R1 apresentaram menor quantidade acumulada de massa fresca em relação ao biótipo R2. Os biótipos R1 e R2 não tiveram sua massa fresca significativamente reduzida em doses de até 45 e 90 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ , respectivamente, indicando

sua baixa susceptibilidade ao glyphosate nessas doses, diferentemente do que ocorreu com os biótipos S1 e S2 que já na dose de 45 g e.a. ha<sup>-1</sup> apresentavam redução de 47% e 32% na massa fresca acumulada, respectivamente. Além disso, na dose de 180 g e.a. ha<sup>-1</sup>, os biótipos S1, S2 e R1 apresentaram redução na massa fresca na ordem de 85%, 86% e 69%, respectivamente; enquanto apenas 11% de redução foi observado para o biótipo R2.

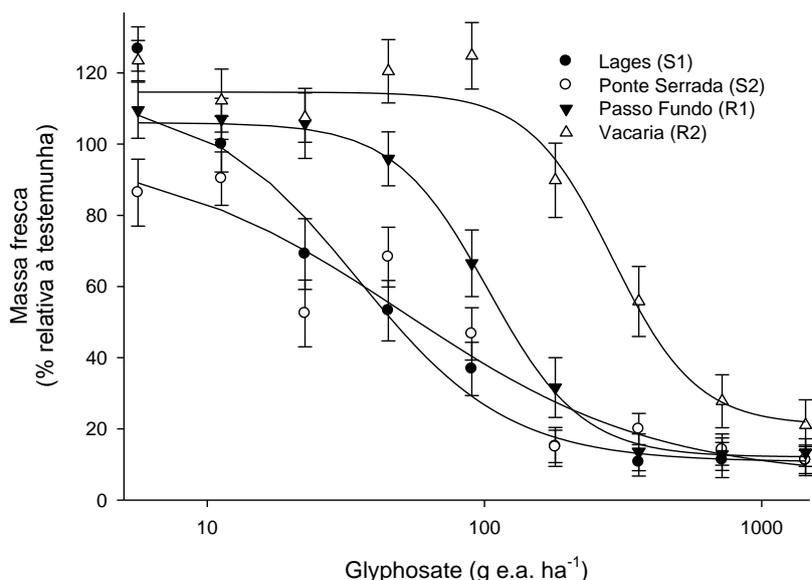


Figura 1. Curvas de dose-resposta de biótipos de *Lolium multiflorum* provenientes de Santa Catarina (S1 – Lages; S2 – Ponte Serrada) e Rio Grande do Sul (R1 – Passo Fundo; R2 – Vacaria) a glyphosate.

De acordo com a análise de regressão (com curvas ajustadas altamente significativas, resíduos de distribuição normal e variâncias homogêneas), a dose requerida para reduzir a massa fresca em 50% foi de 35 g e.a. ha<sup>-1</sup>, 52 g e.a. ha<sup>-1</sup>, 104 g e.a. ha<sup>-1</sup> e 290 g e.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente para os biótipos S1, S2, R1 e R2 (Tabela 1). Esses resultados indicaram fatores de resistência distintos entre os biótipos, quando comparados ao biótipo com menor EC50. Assim, o biótipo S2 apresentou FR de 1,5, indicando que tolera doses 1,5 vez maiores que o biótipo S1; enquanto R1 apresentou FR de 3,0, indicando que tolera doses 3,0 vezes maiores que o biótipo S1; e R2 apresentou FR de 8,3, indicando que tolera doses 8,3 vezes maiores que o biótipo S1. Os resultados indicam que os biótipos R1 e R2 apresentaram-se resistentes a glyphosate, enquanto o biótipo S2, provavelmente, apenas apresentou grau de susceptibilidade menor ao glyphosate que o biótipo S1, mas ambos apresentaram-se susceptíveis ao herbicida.

Cabe ressaltar, ainda, que apenas os biótipos susceptíveis (S1 e S2) morreram em doses de 1.440 g e.a. ha<sup>-1</sup>, os resistentes (R1 e R2) sobreviveram. Além disso, apesar de ter

ocorrido grande redução da massa fresca dos biótipos resistentes em doses abaixo daquelas recomendadas no campo (720 e 1.440 g e.a. ha<sup>-1</sup>), deve lembrar-se de que o experimento foi realizado em ambiente controlado e em recipientes pequenos (300 mL), com recursos limitados, o que, comprovadamente, aumenta a sensibilidade das plantas à exposição aos herbicidas, independente da resistência. Portanto, doses menores de 720 g e.a. ha<sup>-1</sup>, nas condições experimentais, certamente são mais eficientes, ou seja, promovem efeitos deletérios mais intensos, na redução do crescimento dos biótipos resistentes e susceptíveis do que em condições de campo.

Tabela 1. Parâmetros da equação e resumo da análise estatística usada para estimar a resposta de biótipos de *Lolium multiflorum* provenientes de Santa Catarina (S1 – Lages; S2 – Ponte Serrada) e Rio Grande do Sul (R1 – Passo Fundo; R2 – Vacaria) a glyphosate.

Biótipo	Parâmetros da Equação <sup>1</sup>				ANOVA <sup>2</sup>			CVT <sup>3</sup>	NT <sup>4</sup>	FR <sup>5</sup>
	min	max	EC50	Hillslope	R <sup>2</sup>	F	P			
S1	10,7	113,3	35	1,605	0,94	45,57	< 0,001	0,101	0,581	1,0
S2	6,1	99,1	52	0,960	0,89	26,02	< 0,001	0,682	0,542	1,5
R1	12,1	106,1	104	2,574	0,99	532,75	< 0,001	0,086	0,752	3,0
R2	21,1	114,6	290	2,871	0,94	44,09	< 0,001	0,076	0,999	8,3

<sup>1</sup> Equação de regressão:  $y = \min + (\max - \min) / [1 + (x^{\text{Hillslope}} / \text{EC50})]$ , onde min é o valor mínimo de massa fresca, max é o valor máximo de massa fresca, EC50 é o ponto de inflexão da curva (representa a dose de herbicida requerida para reduzir a massa fresca em 50%) e Hillslope é a inclinação da curva no ponto EC50. <sup>2</sup> ANOVA: R<sup>2</sup>, F e P são os valores do coeficiente de determinação ajustado e do F e do P (significância), respectivamente, do teste F para análise de regressão não linear. <sup>3</sup> CVT é o valor de significância (P) do teste de homogeneidade de variância. <sup>4</sup> CVT é o valor de significância (P) do teste de normalidade de resíduos. <sup>5</sup> FR indica o fator de resistência = EC50(S2, R1 ou R2) / EC50(S1)

A redução do crescimento de plantas expostas a glyphosate decorre da inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), na via metabólica do chiquimato. Essa inibição resulta em redução na síntese dos aminoácidos aromáticos que são requeridos na síntese proteica (SIEHL, 1997), assim como produtos derivados dessa via metabólica, como ácido indolacético, lignina e metabólitos secundários que atuam na defesa da planta (LYDON; DUKE, 1989). A desregulação dessa via metabólica também causa carência de compostos necessários à fixação de carbono (SIEHL, 1997), processo rapidamente inibido pela ação do herbicida (SERVAITES et al., 1987). A consequência final da inibição na síntese desses compostos é a morte da planta exposta ao glyphosate. No entanto, plantas resistentes apresentam mecanismos que impedem que o glyphosate interrompa a via do chiquimato, permitindo que seu metabolismo permaneça ativo.

Conforme discutido por Carvalho et al. (2012), os mecanismos de resistência de plantas daninhas a glyphosate decorrem de: (i) limitação na absorção e/ou na translocação do herbicida na planta, que pode estar associado ao seu sequestro no vacúolo, o que impede que quantidades suficientes de herbicida atinjam seu sítio de ação, levando à inibição da via do chiquimato, (ii) mutação genética da enzima EPSPS, impedindo que o herbicida se ligue à enzima, (iii) amplificação da expressão gênica da EPSPS, o que

umenta a produção dessa enzima, permitindo que mais EPSPS exista na planta e, assim, a quantidade absorvida do herbicida não seja suficiente para matar a planta, e (iv) degradação do glyphosate na planta, reduzindo a quantidade do herbicida absorvido a níveis não-letais.

### CONCLUSÃO

Dos três biótipos com suspeita de resistência a glyphosate, um deles (S2 – de Ponte Serrada, SC) não deve ser considerado resistente, pois o fator de resistência é baixo; no entanto, os biótipos provenientes do Rio Grande do Sul (R1 – Passo Fundo – e R2 – Vacaria) são resistentes ao herbicida, com fatores de resistência de 3,0 e 8,3, respectivamente, indicando que R2 é mais resistente que R1.

### AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado a primeira e terceira autoras. À FUMDES pela concessão de bolsa de Doutorado a quarta autora. Ao CNPq concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa a sexta autora.

### REFERÊNCIAS

- CARVALHO, L. B. et al. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 615-622, 2012.
- HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. **Brazil**. Disponível em: <[www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)>. Acesso em: 09 mai. 2014.
- LYDON, J.; DUKE, S. O. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. **Pest Management Science**, v. 25, n. 4, p. 361-373, 1989.
- SERVAITES, J. C. et al. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, v. 85, n. 2, p. 370-374, 1987.
- SIEHL, D. L. Inhibitors of EPSPS synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. In: ROE, R. M. et al. (Eds). **Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology**. IOS Press: Amsterdam, The Netherlands, 1997. p. 37-67.