

HERANÇA DA RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS EM BIÓTIPOS DA PLANTA DANINHA *Euphorbia heterophylla*¹

Inheritance of ALS Inhibitor Resistance in Euphorbia heterophylla Weed Biotypes

VARGAS, L.², BORÉM, A.³ e SILVA, A.A.³

RESUMO - Os herbicidas inibidores da ALS são os principais produtos aplicados para o controle da planta daninha amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) em lavouras de soja; no entanto, já foram identificados biótipos desta planta daninha resistentes a estes herbicidas no Brasil. O objetivo desta pesquisa foi estudar a herança, o número de genes que conferem a resistência e o grau de resistência dos biótipos homocigotos e heterocigotos resistentes. Foram realizados cruzamentos recíprocos entre os genitores suscetíveis e resistentes para obtenção de sementes F₁ e, posteriormente, realizaram-se os retrocruzamentos (RC) com os genitores resistente (R) e suscetível (S). Plantas F₁ foram autofecundadas artificialmente para obtenção da geração F₂. As plantas F₁, F₂, RC_r e RC_s e dos genitores foram tratadas com o herbicida imazethapyr (150 g ha⁻¹). Para avaliar o grau de resistência, plantas F₁ e os genitores resistente e suscetível foram tratados com as doses de imazethapyr de 0, 100, 200, 400, 800 e 1.600 g ha⁻¹. As plantas F₁ mostraram-se totalmente resistentes ao herbicida, demonstrando que a resistência é nuclear e dominante. As plantas F₂ apresentaram alta probabilidade para segregação 3:1, indicando que a resistência é codificada por um gene dominante. A aplicação de doses de imazethapyr sobre as plantas F₁ demonstrou que os biótipos homocigotos resistentes e os heterocigotos apresentam o mesmo grau de resistência para doses de até 1.600 g ha⁻¹ deste herbicida. A resistência é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa.

Palavras-chave: resistência de plantas daninhas, hibridação, dominância, acetolactato sintase.

ABSTRACT - The ALS inhibitor herbicides are the main products applied to control *Euphorbia heterophylla* in the soybean crop; however, resistant biotypes to these herbicides have been identified in Brazil. This research aimed to study the inheritance, number of genes involved in the resistance and the degree of resistance of the homozygous and heterozygous resistant biotypes. Reciprocal crossings (RSs) were carried out between susceptible (S) and resistant (R) parents to obtain F₁ seeds. Individuals from F₁, F₂, RC_r and RC_s and parents were sprayed with imazethapyr (150 g ha⁻¹). To evaluate the resistance degree, F₁ plants and the resistant and susceptible parents were sprayed with imazethapyr (0, 100, 200, 400, 800 and 1,600 g ha⁻¹). F₁ plants were totally resistant to the herbicide, demonstrating that resistance is nuclear and dominant. F₂ presented high probability for 3:1 segregation, indicating that resistance is coded by a dominant gene. The experiment with F₁ plants sprayed with rates of imazethapyr, demonstrated that dominance is complete.

Key words: herbicide resistance, hybridization, dominance, inheritance, acetolactate synthase.

INTRODUÇÃO

O amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) é uma planta daninha herbácea, ereta, com 40-60 cm de altura, com ciclo de 2 a 3 meses e

que se reproduz por sementes. É uma espécie com características variáveis - especialmente as folhas exibem grande variabilidade morfológica dentro de uma população - e nativa das regiões tropicais e subtropicais das américas.

¹ Recebido para publicação em 24/7/2001 e na forma revisada em 17/12/2001.

² Eng.-Agrônomo, D.S. Professor da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Unai, 38610-000 Unai-MG. ³ Eng.-Agrônomo, D.S. Professor da Universidade Federal de Viçosa-UFV, 36571-000 Viçosa-MG.



É uma infestante com alta capacidade competitiva, com rápido crescimento e multiplicação (Kissmann & Groth, 1992).

O uso repetido do mesmo herbicida ou de herbicidas com mesmo mecanismo de ação para controle de plantas daninhas tem exercido alta pressão de seleção, provocando mudanças na flora de algumas regiões. Em geral, espécies ou genótipos de uma espécie que melhor se adaptam a uma determinada prática são selecionados e multiplicam-se rapidamente (Holt & Lebaron, 1990).

Os herbicidas pertencentes aos grupos químicos imidazolinonas e sulfoniluréias agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetoidroxiácido sintase (AHAS), que atua na rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Hess, 1994). Esses herbicidas são largamente utilizados, devido à sua baixa toxicidade a animais, alta seletividade às culturas e alta eficiência mesmo em doses baixas. Aproximadamente cinco anos após o início do uso desses herbicidas surgiu o primeiro biótipo resistente (Powles & Holtum, 1994). Evidências sugerem que o aparecimento de resistência a um herbicida em uma população de plantas se deve à seleção de um genótipo resistente preexistente, que, devido à pressão de seleção exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida, encontra condições para multiplicação (Betts et al., 1992).

Existem diversos fatores relacionados à população de plantas que interagem e determinam a probabilidade e o tempo de evolução da resistência, dentre os quais se destacam: número de alelos envolvidos na expressão da resistência; frequência do(s) alelo(s) da resistência na população inicialmente suscetível; modo de herança do(s) alelo(s) da resistência (materna ou paterna); características reprodutivas da espécie; pressão de seleção; e taxa de cruzamentos entre biótipos resistentes e suscetíveis (Mortimer, 1998).

Quanto maior o número de genes envolvidos na resistência, menor será a probabilidade de surgir biótipos resistentes em uma população. A frequência de alelo de resistência nas populações nativas geralmente está entre 10^{-16} e 10^{-6} (Mortimer, 1998), e, quanto maior for a frequência do alelo, maior será a probabilidade de seleção de um biótipo resistente.

O tipo de herança é um aspecto importante no estabelecimento da resistência em uma população de plantas. Existem dois tipos de herança: a citoplasmática (materna) e a nuclear. Herança citoplasmática é aquela em que os caracteres hereditários são transmitidos via citoplasma; assim, somente a planta-mãe transmitirá a resistência para os descendentes. Um exemplo são as plantas resistentes às triazinias. Por outro lado, se a herança for nuclear, tanto o pai quanto a mãe podem transmiti-la.

O processo da evolução da resistência a herbicidas, resumidamente, passa por quatro estádios: eliminação dos biótipos altamente suscetíveis, restando apenas os mais tolerantes e resistentes; eliminação de todos os biótipos, exceto os resistentes, e seleção destes dentro de uma população com alta tolerância; inter-cruzamento entre os biótipos sobreviventes, gerando novos indivíduos com maior grau de resistência, que serão selecionados futuramente; e segregação e recombinação de genes (Mortimer, 1998).

Biótipos resistentes podem ocorrer em uma população de plantas daninhas como resultado de mutações que provocam alterações no local de ação do herbicida. Uma pequena alteração no polipeptídeo pode resultar em grande efeito sobre a afinidade com a molécula herbicida (Betts et al., 1992). A resistência de *Arabidopsis thaliana* às imidazolinonas se deve à alteração de um aminoácido da ALS (Sathasivan et al., 1991). A resistência a imidazolinonas e sulfoniluréias é conferida por um gene dominante nuclear (Mazur & Falco, 1989; Powles & Holtum, 1994).

O uso repetido de herbicidas inibidores da ALS, em lavouras de soja nos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, levou à seleção de biótipos de *Bidens pilosa* resistentes a esses herbicidas (Ponchio, 1997). Biótipos de *E. heterophylla* resistentes a imidazolinonas vêm sendo observados em lavouras de soja no Estado do Rio Grande do Sul e acredita-se que o uso repetido de herbicidas desse grupo seja a causa desse fenômeno.

O conhecimento dos mecanismos e fatores que favorecem o aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes é fundamental para que técnicas de manejo sejam utilizadas no sentido de evitar ou retardar o seu aparecimento (Christoffoleti et al., 1994). O

objetivo deste trabalho foi estudar o tipo de herança, o número de genes que conferem a resistência e o grau de resistência dos biótipos de *E. heterophylla* homocigotos e heterocigotos resistentes aos inibidores da ALS.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, em 1999.

Para obtenção dos genitores homocigotos resistentes e homocigotos suscetíveis, foram realizadas autopolinizações em 72 plantas de amendoim-bravo resistentes e em seis suscetíveis. As sementes produzidas em cada planta autopolinizada foram colhidas e armazenadas separadamente e mantidas em geladeira a 4-5 °C durante cinco dias, para quebra da dormência. Para testar a homocigose, foram semeadas, de cada planta autopolinizada, 20 sementes em uma bandeja contendo 10 kg de solo. Quando as progênies atingiram estágio de 3-4 folhas, aplicou-se o herbicida imazethapyr, na dose de 200 g ha⁻¹. Todos os genitores onde ocorreu morte de pelo menos uma planta, entre as 20 testadas, foram descartados, e os demais foram considerados homocigotos resistentes ao herbicida. Por outro lado, foram considerados homocigotos suscetíveis aqueles genitores em que todas as 20 plantas testadas mostraram-se suscetíveis ao tratamento herbicida. Foram selecionados 69 genitores homocigotos resistentes e seis homocigotos suscetíveis ao imazethapyr.

Para realizar os cruzamentos, selecionou-se um genitor homocigoto resistente e um homocigoto suscetível. Sementes de cada genitor foram semeadas em vasos contendo 3 kg de solo. Após a emergência das plantas procedeu-se ao desbaste, deixando uma planta por vaso. A adubação química (250 kg ha⁻¹ de 5-20-20) foi realizada na instalação do experimento, obedecendo à análise química do solo.

Foram feitos cruzamentos recíprocos entre os genitores suscetíveis e resistentes para obtenção de sementes F₁. Posteriormente, foram realizados retrocruzamentos entre plantas F₁ e os respectivos genitores masculinos e femininos resistentes (RC_r) e suscetíveis (RC_s). Sementes F₁ foram semeadas em vasos, e as plantas originadas destas sementes foram autofecundadas para obtenção da F₂. As

sementes F₁, F₂, RC_r e RC_s e dos genitores foram semeadas em bandejas com capacidade para 10 kg de solo; após a aplicação do herbicida imazethapyr (150 g ha⁻¹), avaliou-se a sua reação ao herbicida. As frequências das classes obtidas foram testadas pelo teste qui-quadrado.

Foram semeadas, em bandejas contendo 10 kg de solo, as sementes F₁ e dos genitores resistente e suscetível. As plantas originadas destas sementes foram tratadas com doses crescentes de imazethapyr (0, 100, 200, 400, 800 e 1.600 g ha⁻¹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de plantas, o número de plantas resistentes e suscetíveis, as relações observadas e esperadas, bem como os valores do teste χ^2 e as respectivas probabilidades, estão contidos na Tabela 1. A Figura 1 representa um retrocruzamento suscetível (RCs) com segregação resistente suscetível 1:1.

Os genitores resistente (R) e suscetível (S) confirmaram, respectivamente, sua resistência e suscetibilidade ao herbicida.

No primeiro cruzamento suscetível x resistente (S x R), a F₁ apresentou-se totalmente resistente, demonstrando que a resistência é transmitida hereditariamente e é dominante. A população F₂ apresentou segregação resistente/suscetível 3,1:1, com teste qui-quadrado fornecendo probabilidade de 82% de esta ser 3:1. O retrocruzamento suscetível (RCs) apresentou segregação resistente/suscetível 0,9:1, com probabilidade de 90% de ser 1:1 (Figura 1). Já o retrocruzamento resistente (RCr) apresentou plantas totalmente resistentes, evidenciando, também, o caráter dominante da resistência. Todos esses resultados são concordes entre si.

No cruzamento recíproco, resistente x suscetível (R x S), a geração F₁, como no primeiro cruzamento, mostrou-se totalmente resistente, indicando que a resistência também é transmitida hereditariamente pela planta-mãe e, novamente, que a resistência é uma característica dominante. A população F₂ apresentou segregação resistente/suscetível 3,1:1, com probabilidade de 79% de ser 3:1. O RCs apresentou segregação 1,1:1, com probabilidade de 70% de ser 1:1. O RCr apresentou-se, novamente, totalmente resistente.



Tabela 1 - Avaliação da segregação de cruzamentos, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre genótipos de *Euphorbia heterophylla* suscetíveis (S) e resistentes (R) aos herbicidas inibidores da ALS. Viçosa-MG, 1999

Cruzamentos	Número de Plantas	Resistentes	Suscetíveis	Relação		χ^2	Probabilidade
				Esperada	Observada		
Suscetíveis (S)	150	0	150	-	-	-	-
Resistentes (R)	137	137	0	-	-	-	-
S x R:							
F ₁	73	73	0	1:0	1:0	0,000	1,00
F ₂	170	129	41	3:1	3,1:1	0,070	0,82
RCs	61	30	31	1:1	0,9:1	0,016	0,90
RCr	61	61	0	1:0	1:0	0,000	1,00
R x S:							
F ₁	64	64	0	1:0	1:0	0,000	1,00
F ₂	203	154	49	3:1	3,1:1	0,080	0,79
RCs	82	43	39	1:1	1,1:1	0,190	0,70
RCr	66	66	0	1:0	1:0	0,000	1,00

O valor de χ^2 fornece a probabilidade de as diferenças entre as relações esperada e observada serem devidas ao acaso. Graus de liberdade = 1.



Figura 1 - Retrocruzamento suscetível (RCs) após tratamento com o herbicida imazethapyr (150 g ha⁻¹), com segregação resistente/suscetível 1:1. Plantas resistentes apresentam maior altura, e as suscetíveis, menor. Viçosa, MG, 1999.

A população F_1 , em ambos os cruzamentos, mostrou-se totalmente resistente ao herbicida, demonstrando que a resistência é dominante e nuclear. Esses resultados são confirmados pelos retrocruzamentos analisados. As populações F_2 apresentaram alta probabilidade para o padrão de segregação 3:1, indicando que a resistência é codificada por um gene dominante. Esses resultados estão de acordo com Mazur & Falco (1989), Mallory-Smith et al. (1990) e Powles & Holtum (1994).

Esses resultados sugerem que a resistência apresentada pelos biótipos de amendoim-bravo é codificada por um gene dominante nuclear. As características com herança do tipo nuclear têm disseminação rápida na população, via pólen, em espécies de fecundação cruzada. Contudo, a taxa de alogamia em amendoim-bravo não é conhecida; portanto, não é possível fazer previsões da disseminação deste gene em uma área.

A avaliação das plantas F_1 com doses crescentes de imazethapyr demonstrou que as plantas homozigotas resistentes e as heterozigotas apresentam o mesmo grau de resistência para doses de até 1.600 g ha⁻¹ do herbicida e que as plantas suscetíveis morrem com a dose de 100 g ha⁻¹. O trabalho realizado por Seefeldt et al. (1998) demonstra que biótipos heterozigotos de *Avena fatua*, resistentes ao diclofop, apresentam grau intermediário de resistência ao herbicida. No trabalho destes autores, os biótipos homozigotos suscetíveis e os heterozigotos foram controlados com as doses de 0,55 e 1,1 kg ha⁻¹ de diclofop, respectivamente. Já o biótipo homozigoto resistente não foi controlado com a dose de 5,5 kg ha⁻¹ do mesmo herbicida.

Assim, apesar de as plantas heterozigotas de amendoim-bravo apresentarem o alelo recessivo (suscetível), elas são igualmente resistentes àquelas homozigotas resistentes, que apresentam os dois alelos dominantes (resistentes), sugerindo ação gênica com dominância completa. Esse fato tem implicações práticas importantes, já que, em lavouras infestadas com estas plantas de amendoim-bravo resistentes, o aumento da dose deste herbicida não proporcionará aumento no controle. Assim, a recomendação de aumento da dose do herbicida não é tecnicamente justificável.

CONCLUSÕES

Com base no que foi exposto, conclui-se:

- A resistência aos herbicidas inibidores de ALS em *Euphorbia heterophylla* é controlada por um alelo nuclear dominante.

- Não há diferenças no grau de resistência entre os biótipos homozigotos resistentes e heterozigotos quando submetidos a aplicações de até 1.600 g ha⁻¹ de imazethapyr, sugerindo se tratar de um caso de dominância completa para este gene.

LITERATURA CITADA

- BETTS, K.J.; EHLKE, N.J.; WYSE, D.L.; GRONWALD, J.W.; SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Weed Sci.*, v.40, n.2, p.184-189, 1992.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTÓRIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. *Planta Daninha*, v.12, n.1, p.13-20, 1994.
- HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: HERBICIDE ACTION COURSE, 1994. *Summary of lectures*, West Lafayette, Purdue University, 1994.p.10-23.
- HOLT, J.S.; LeBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technol.*, v.4, n.1, p.141-149, 1990.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. 798p. T II.
- MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; DIAL, M.J.; ZEMETRA, R.S. Inheritance of sulfonylurea herbicide resistance in *Lactuca* spp. *Weed Technol.*, v.4, n.4, p.787-790, 1990.
- MAZUR, B.J.; FALCO, S.C. The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, v.40, p.441-470, 1989.
- MORTIMER, A.M. *Review of graminicide resistance*. 1998. Web: <http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm>, 32p.



- PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* L. a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS.** Piracicaba: ESALQ, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1997.
- POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry.** Boca Raton, CRC Press, 1994. 353p.
- SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G.W.; MURAI, N. Molecular basis of imidazolinone herbicide resistance in *Arabidopsis thaliana* var columbia. **Plant Physiol.**, v.97, p.1044-1050, 1991.
- SEEFELDT, S.S.; HOFFMAN, D.L.; GEALY, D.R.; FUERST, E.P. Inheritance of diclofop resistance in wild oat (*Avena fatua* L.) biotypes from the Willamette Valley of Oregon. **Weed Sci.**, v.46, n.2, p.170-175, 1998.