

RESISTÊNCIA DE BIÓTIPOS DE NABO AO HERBICIDA METSULFUROM-METÍLICO ATRAVÉS DE BIOENSAIO *IN VITRO* DA ENZIMA.

SILVIO THIAGO DE OLIVEIRA RAPHAELLI¹; JOANEI CECHIN², MAICON FERNANDO SCHMITZ², JOSÉ VITOR SILVA DA SILVA², DIRCEU AGOSTINETTO³

¹FAEM - UFPel, Pelotas/RS – thiagoraphaelli@hotmail.com;

²FAEM - UFPel, Pelotas/RS – joaneicechin@yahoo.com.br

²FAEM - UFPel, Pelotas/RS – maicon_schmitz@hotmail.com

²FAEM - UFPel, Pelotas/RS – jsyv01@icloud.com

³FAEM - UFPel – Pelotas/RS – agostinetto.d@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O nabo (*Raphanus sativus* L.) é uma planta de cobertura de solo importante dos sistemas agrícolas do Sul do Brasil. Entretanto, pode ser considerada uma das principais plantas daninhas quando presente nos cultivos de inverno causando prejuízos consideráveis (VARGAS; ROMAM, 2005). O controle químico é essencial para controle de nabo onde o uso repetido de herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) favoreceu a seleção de biótipos resistentes (PANDOLFO et al., 2013). O herbicida metsulfurom-metílico atua inibindo a síntese dos aminoácidos de cadeia lateral valina, leucina e isoleucina onde é amplamente utilizado devido a sua alta eficiência e seletividade, baixa dose aplicada e baixo impacto ambiental (POWLES; YU, 2010).

A resistência acarreta em aumento da dose herbicida (I_{50} - inibição de 50% da atividade da enzima) em biótipos resistentes quando comparado a biótipos suscetíveis podendo inviabilizar a utilização de determinados herbicidas em alguns cultivos (PANDOLFO et al., 2013). Dessa forma, a detecção da resistência é considerada uma etapa importante afim de evitar a disseminação e auxiliar na busca por estratégias de manejo sustentáveis para agricultura.

Ensaio *in vitro* envolvendo a extração da enzima-alvo de ação do herbicida pode ser considerado um método rápido e prático na identificação da resistência (MONQUEIRO; CHRISTOFFOLETI, 2002). O ensaio *in vitro* da enzima ALS baseia-se no acúmulo de acetoína na presença e na ausência da molécula herbicida inibidora da enzima onde apenas biótipos resistentes acumulam acetoína (GERWICK et al., 1993).

O objetivo do estudo é identificar a resistência de biótipos de nabo ao herbicida metsulfurom-metílico através de bioensaio *in vitro* da enzima ALS.

2. METODOLOGIA

As sementes dos biótipos de nabo com suspeita de resistência ao herbicida metsulfurom-metílico foram coletadas de lavouras de trigo do Noroeste do RS sendo devidamente identificadas e georreferenciadas. A semeadura ocorreu em maio de 2013 em vasos plásticos com capacidade para 0,75L preenchidos com substrato+solo. Os biótipos cresceram em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel por um período de 40 dias e após foi executado o ensaio *in vitro* em laboratório.

O método de extração enzimática seguiu a metodologia descrita por SINGH et al. (1988) com modificações. Para cada um dos biótipos testados foram utilizados 7g de folhas novas, congeladas em nitrogênio líquido (N₂) e maceradas

até formar pó fino. Ao material macerado foi acrescido 70mL (1:10 p/v) do tampão de extração fosfato 100mM, pH 7,5 a 4°C contendo: 0,5mM de cloreto de magnésio (MgCl_2); 10mM de piruvato de sódio; 0,5mM de tiamina pirofosfato (TPP); 10 μM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); 10% v/v de glicerol; 1mM de ditioneitol e 5% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O material foi homogeneizado e mantido sob agitação por 20 minutos a 4°C em banho de gelo onde a mistura foi filtrada com gaze para remoção e descarte dos resíduos sólidos. A fração líquida foi centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada onde o sobrenadante foi reservado e o resíduo sólido foi descartado.

O bioensaio *in vitro* da enzima foi realizado em experimento conduzido em delineamento experimental completamente casualizado com três repetições, seguindo a metodologia proposta por GERWICK et al. (1993) com algumas modificações. O bioensaio foi realizado em tubos de ensaio onde os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial onde o fator A foi composto da solução enzimática dos diferentes biótipos (B_1 ; B_4 e B_{13}) onde cada tubo recebeu 600 μL da solução (enzima) e, o fator B foi composto de diferentes concentrações do herbicida metsulfurom-metilico (0; 0,01; 0,1; 1,0; 5,0; 10; 50 e 100 μM) onde foi acrescido 100 μL da solução herbicida em cada tubo de ensaio. Além disso, cada tubo recebeu 300 μL do tampão de reação fosfato 80 μM totalizando 1000 μL (volume final da reação). O bioensaio conteve dois tratamentos padrão sem herbicida: o primeiro denominado 0 (zero) e o segundo com 100% de atividade, sendo que o primeiro recebeu 50 μL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3M no início do bioensaio para impedir a atividade da enzima e, o segundo, considerado o tratamento padrão, correspondendo à testemunha sem inibidor foi adicionado 100 μL de água milli-Q.

Os valores de absorbância (zero atividade) foram descontados dos valores das leituras dos demais tratamentos com herbicida ou inibidor enzimático. Após o preparo da reação, os tubos de ensaio foram incubados por 60 minutos a 30°C. A reação foi interrompida com adição de 50 μL de solução de H_2SO_4 3M em cada tubo de ensaio, exceto no controle zero onde a reação já havia sido interrompida inicialmente. A segunda incubação, por 15 minutos a 60°C, foi realizada para a formação da acetoína. Para formação do complexo colorido foram adicionados 1000 μL de solução de creatina a 0,5% e 1000 μL de 1-naphtol a 5% p/v preparado em hidróxido de sódio (NaOH – 2,5M) no momento do uso. A reação foi novamente incubada por 15 minutos a 60°C para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorbância lida em espectrofotômetro a 530nm.

A atividade da enzima ALS obtida através da quantidade de acetoína produzida ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$) foi expressa em percentagem (%) e determinada em função da curva padrão de acetoína e de proteína (não demonstrado). Os valores de absorbância foram corrigidos subtraindo-se o valor do controle zero e, o I_{50} foi calculado através da regressão não linear do tipo logístico (SEEFELDT et al., 1995) utilizando o software SigmaPlot 12.3 (SIGMAPLOT, 2012). O fator de resistência (FR) foi calculado pela divisão do I_{50} do biótipo resistente pelo valor correspondente do biótipo suscetível (HALL et al., 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos para o ensaio *in vitro* da enzima ALS na presença do herbicida evidenciou interação entre o fator biótipos e doses do herbicida

metsulfurom-metílico (Figura 1). Os resultados demonstraram que foi necessário $0,038\mu\text{M}$ do herbicida metsulfurom-metílico para inibir 50% (I_{50}) da atividade da enzima ALS do biótipo suscetível enquanto que a I_{50} dos biótipos resistentes (B_4 e B_{13}) foi de $1,70$ e $1,69\mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos em biótipos de *R. raphanistrum* L. onde a I_{50} da enzima ALS do biótipo resistente e suscetível ao herbicida clorosulfurom foi de $1,55$ e $0,009\mu\text{M}$, respectivamente, (YU et al., 2012).

Com base na não sobreposição dos intervalos de confiança (IC) (Figura 1, Tabela 1) entre o biótipo suscetível (B_1) e os resistentes (B_4 e B_{13}) foi possível estabelecer o fator de resistência (FR). O valor de FR constatado foi de 45 e 44 para o B_4 e B_{13} , respectivamente (Tabela 1). Resultados similares foram constatados em plantas daninhas resistentes a herbicidas inibidores da ALS com local de ação alterado onde apresentaram elevado FR (HAN et al., 2012). Com base no FR obtido, pode-se afirmar que os biótipos B_4 e B_{13} são resistentes ao herbicida metsulfurom-metílico pois apresentaram FR superior a 10, critério usado para confirmar a resistência de plantas daninhas a herbicidas (BECKIE et al., 2012) sendo possível sua detecção através do bioensaio *in vitro* da enzima ALS.

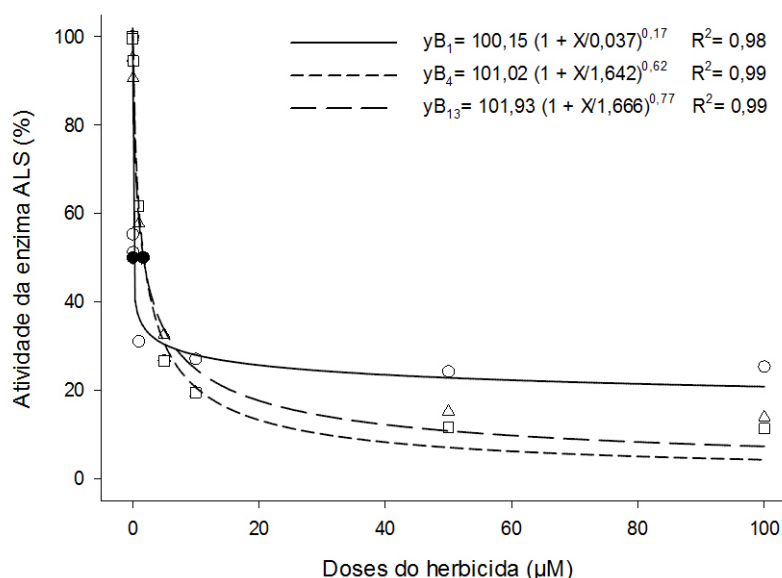


Figura 1- Inibição *in vitro* da atividade da enzima ALS (%) em biótipos de nabo suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) submetido a doses (μM) do herbicida metsulfurom-metílico. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2016.

Tabela 1- Valores do I_{50} , intervalo de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de nabo suscetível (B_1) e resistentes (B_4 e B_{13}) submetidos à aplicação de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metílico. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2016.

Biótipo	I_{50}^1		Fator de resistência ² (FR)
	μM	95 IC	
Suscetível (B_1)	0,038	0,07 - (-)0,007	-
Resistente (B_4)	1,70	2,14 – 1,26	45,00
Resistente (B_{13})	1,69	2,04 – 1,34	44,00

¹ I_{50} = dose necessária para obter uma inibição de 50% da atividade da enzima ALS.

²FR obtido pela divisão do I_{50} do biótipo resistente pelo I_{50} do biótipo suscetível.

4. CONCLUSÃO

O ensaio *in vitro* pode ser usado para detecção da resistência em biótipos de nabo onde foi constada a suscetibilidade para B₁ enquanto os biótipos B₄ e B₁₃ são resistentes ao herbicida metsulfurom-metilico apresentando I₅₀ de 1,70 e 1,69µM e FR de 45 e 44, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKIE, H. J.; WARWICK, S.I.; SAUDER, C.A.; KELLN, G.M.; LOZINSKI, C. Acetolactate synthase inhibitor-resistant false cleavers (*Galium spurium*) in Western Canada. **Weed Technology**, Fayetteville, v.26, n.1, p.151-155, 2012.

GERWICK, B.C.; MIRELES, L.C.; EILERS, R.J. Rapid diagnosis of ALS/AHAS inhibitor herbicide resistant weeds. **Weed Technology**, Champaign, v.7, n.2, p.519-524, 1993.

HALL, L.M.; STROMME, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactato sintase inhibithors and quinclorac in biotypes of false clover (*Gallium sourium*). **Weed Science**, Oxford, v.46, n.4, p.390-396, 1998.

HAN, H.; YU, Q.; PURBA, E.; WALSH, M.; FRIESEN, S.; POWLES, S.B. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, Oxford, v.68, n.8, p.1164-1170, 2012.

MONQUEIRO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Bioensaio rápido de determinação da sensibilidade da acetolactato sintase (ALS) a herbicidas inibidores. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.193-196, 2001.

PANDOLFO, C.E.; PRESOTTO, A.; POVERENE, M.; CANTAMUTTO, M. Limited occurrence of resistant radish (*Raphanus sativus*) to ahas-inhibiting herbicides in Argentina, **Planta Daninha**, Viçosa, v.31, n.3, p.657-666, 2013.

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, California, v.61, n.1, p.317-347, 2010.

SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, Champaign, v.9, n.2, p.218-227, 1995.

SINGH, B.K.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Assay of acetohydroxyacid synthase. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v.171, n.1, p.173-179, 1988.

VARGAS, L.; ROMAM, E. S. Seletividade e eficiência de herbicidas em cereais de inverno. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v.1, n.3, p.1-10, 2005.

YU, Q.; HAN, H.; LI, M.; PURBA, E.; WALSH, M.J.; POWLES, S.B. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed Research**, Malden, v.52, n.2, p.178-186, 2012.