

METODOLOGIA E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

NOTA

BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS⁽¹⁾

PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI^(2,3)

RESUMO

Com o uso intensivo de herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) em áreas cultivadas com soja, no município de São Gabriel d'Oeste (MS), Brasil, selecionou-se um biótipo resistente da planta daninha *Bidens pilosa*. A confirmação bioquímica desta resistência, no entanto, é muito difícil de ser feita em campo. Assim, realizou-se um bioensaio com o objetivo de testar a sensibilidade da ALS desse biótipo aos herbicidas inibidores dessa enzima, por meio da aplicação simultânea de herbicidas inibidores da ALS e da KARI (cetoácido reductoisomerase). Para a inibição desta última enzima, utilizou-se o teste CPCA (ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico). Por ele, confirmou-se que a resistência do biótipo de *Bidens pilosa* é decorrente da insensibilidade da ALS aos herbicidas, que visam inibi-la; pois, quanto maior a quantidade de acetoina, maior é a atividade da enzima e mais intensa a coloração desenvolvida, proporcionando maiores valores nas leituras de absorbância.

Palavras-chave: resistência a herbicidas, biótipos, *Bidens pilosa*.

ABSTRACT

BIOASSAY TO DETERMINE WEED BIOTYPE RESISTANCE TO ALS-INHIBITING HERBICIDES

The intensive use of acetolactate synthase (ALS) inhibitor herbicides in soybean production areas at São Gabriel d'Oeste, State of Mato Grosso do Sul (Brazil), selected a resistant biotype of *Bidens pilosa* to this type of herbicide. However, field biochemical characterization of this resistance is difficult. Therefore, it was developed a bioassay to test the lack of sensitivity of the ALS enzyme of this biotype to the inhibitor herbicides. The bioassay consisted of simultaneous application of herbicides inhibitors of ALS and KARI (ketoacidreductoisomerase). CPCA (1,1-ciclopropanodi-carboxylic acid) was used for the inhibition of the KARI enzyme. This bioassay confirmed that the resistance of the R biotype of *Bidens pilosa* is due to a lack of sensitivity of the ALS enzyme to these herbicides: the higher acetoin contents produced, the higher enzyme activity and more intense the color developed.

Key words: herbicide resistance, biotypes, *Bidens pilosa*.

Os herbicidas classificados como inibidores da ALS pertencem aos grupos químicos das imidazolinonas, sulfoniluréias, pirimidiloxitiobenzoato e triazolopyrimidinas sulfoanilidas. Embora diferentes quimicamente, possuem o mesmo mecanismo de ação, que é a inibição da acetolactato sintase, também conhecida como acetohidroxiácido sintase (AHAS).

A ALS participa na biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina em microrganismos e plantas, catalisando duas reações iniciais paralelas: condensação de dois mols de piruvato para formar acetolactato (produto final valina e leucina) e condensação de um mol de piruvato com um mol de 2- α -cetobutirato para formar acetohidroxibutirato (produto final isoleucina) (EBERLEIN et al., 1997).

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 3 de janeiro e aceito em 3 de outubro de 2001.

⁽²⁾ Departamento de Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Caixa Postal 9, 13418-900 Piracicaba (SP). E-mail: pjchrist@carpa.ciagri.usp.br

⁽³⁾ Com bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

Verifica-se na literatura que a ALS é o principal sítio de ação desses herbicidas. RAY (1984) demonstrou que a aplicação exógena dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina é capaz de evitar o efeito fitotóxico quando são aplicados em plantas suscetíveis, pois a ALS é uma das enzimas-chaves no processo metabólico de síntese desses aminoácidos; a aplicação destes, de forma exógena, é capaz de evitar o efeito herbicida dos inibidores da ALS devido à absorção pela planta. No entanto, alguns pesquisadores têm demonstrado que, de maneira geral, paralisam a divisão celular, reduzem a síntese de proteínas, inibem a translocação de carboidratos e, conseqüentemente, reduzem o crescimento das plantas (RAY, 1984). Desse modo, especula-se que somente a ausência dos aminoácidos não é suficiente para o controle do organismo. Convém mencionar que o composto oxoisovalerato, produto desta rota metabólica, é precursor da coenzima A (CoA), a qual é necessária para a síntese de acetil-CoA (VIDAL, 1997).

A seletividade desses herbicidas em algumas culturas como soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e trigo (*Triticum aestivum* L.) tem como base a habilidade das plantas em metabolizar o herbicida em formas não-tóxicas (SWEESTER et al., 1982). Do mesmo modo, a inativação da molécula herbicida pelo metabolismo diferencial é encontrada em plantas daninhas como *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv; *Solanum nigrum* (L.) e *Sorghum halepense* (L.) Pers. (HUTCHISON et al., 1984).

SHEN et al. (1994) mostraram, pelas análises da enzima extraída de plântulas de ervilha, duas formas da ALS (ALS I e II), que possuem diferenças significativas em suas propriedades físicas e cinéticas. Os valores K_m das ALS I e II foram de 9,0 mM e 48 mM e o peso molecular 124 e 244 Kda respectivamente. Encontraram-se, também, diferenças em relação à retroinibição pelos aminoácidos e sensibilidade ao herbicida imazapic, do grupo químico das imidazolinonas.

As plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS têm-se tornado um problema em vários países. Atualmente, segundo HEAP (2000), há 55 espécies delas apresentando biótipos resistentes. As espécies que possuem biótipos resistentes confirmados no Brasil, até o momento, são: *Bidens pilosa* (PONCHIO, 1996; CHRISTOFFOLETI et al., 1997); *Bidens subalternans* (MONQUEIRO, 1999); *Euphorbia heterophylla* (GAZZIERO et al., 1998); *Sagittaria montevidensis* (NOLDIN et al., 2000).

Existem diversos métodos de pesquisa que visam à identificação da resistência das plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS. PONCHIO (1996) realizou bioensaios *in vitro* com a ALS extraída de biótipos resistentes e suscetíveis de *B. pilosa*. Após a extração,

as enzimas foram incubadas com os herbicidas imazethapyr, chlorimuron-ethyl, pirimidiloxibenzoato e flumetsulan, demonstrando a insensibilidade da ALS proveniente das plantas resistentes.

GERWICK et al. (1993), SIMPSON et al. (1995) e LOVELL et al. (1996) desenvolveram um teste rápido para detectar a resistência, mediante ensaio com a ALS, no qual o ácido ciclopropanodicarboxílico (CPCA) é usado para inibir a cetooácido reductoisomerase (KARI). Esta enzima, segundo DUMAS et al. (1994), catalisa a segunda reação na rota metabólica de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, na qual os substratos acetolactato e acetohidroxibutirato são convertidos em 2,3-dihydroxi-3-isovalerate ou 2,3-dihydroxy-3-methylvalerate respectivamente.

Além do CPCA, o produto HOE 704 transloca-se por toda a planta, inibindo a atividade da KARI (DUMAS et al., 1994). Segundo GERWICK et al. (1993), o baixo custo do CPCA e a facilidade de encontrá-lo comercialmente fazem desse produto a melhor opção para testes rápidos de resistência.

Quando a mistura CPCA + herbicida inibidor da ALS é aplicada em plantas suscetíveis, o acetolactato não se acumula, pois a ALS é inibida pelo herbicida. O contrário ocorre em plantas resistentes, pois, nestas, a ALS é insensível à ação dos herbicidas, fazendo com que haja síntese de acetolactato que, por sua vez, acumula-se devido à inibição da KARI, pelo CPCA. Quando a quantificação do acetolactato é desejada, utiliza-se o método de WESTERFELD (1945), que tem como princípio a formação de um complexo colorido, em função da reação entre acetoina, creatina e naphthol, cuja densidade óptica de 530 nm é proporcional à concentração do acetolactato formado.

Na maior parte dos casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS, o mecanismo de resistência é decorrente de uma alteração da ALS no sítio-alvo do herbicida, que a torna insensível. A ALS possui 670 aminoácidos e algumas modificações têm sido identificadas em cinco regiões altamente conservadas (domínios) dos genes codificadores. Esses domínios variam em relação ao tamanho (12-57 pares de base) e são referidos como domínios A a E. O domínio A, que possui a seqüência AITGQVPRRRMIGT, e o domínio B - QWED, são os mais conhecidos. As outras regiões são: domínio C - VFAYPGGASMEIHQALTRS, domínio D - AFQETO, e domínio E - IPSGG (BOUTSALES et al., 1999).

As seqüências de aminoácidos evidenciam que a resistência de biótipos de *Lactuca sativa* é conferida por um único ponto de mutação, da prolina 197 para histidina, no domínio A da proteína ALS. Essa mesma substituição foi observada em biótipos de *Lactuca serriola*. Os valores K_m da ALS isolada de

biótipos resistentes e suscetíveis de *Lactuca sativa* foram de 7,3 e 11,1 nM respectivamente, sugerindo que o alelo resistente não altera a ligação do piruvato na ALS (EBERLEIN et al., 1999).

A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o uso de um bioensaio rápido para comprovação científica da resistência de biótipos de plantas daninhas a herbicidas inibidores da ALS. Por intermédio do bioensaio, é possível verificar se a resistência é causada por uma insensibilidade da ALS do biótipo resistente aos herbicidas inibidores dessa enzima, insensibilidade que é transmitida geneticamente.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba (SP). As sementes de *Bidens pilosa*, resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, foram coletadas em áreas produtoras de soja no município de São Gabriel d'Oeste (MS). Nessa área, o manejo de plantas daninhas do tipo folha-larga apresentava histórico de pelo menos oito anos de uso consecutivo de herbicidas inibidores da ALS e suspeitava-se do desenvolvimento de resistência, sendo essa população denominada biótipo resistente (R).

A amostra de semente de planta daninha, suscetível aos herbicidas inibidores da ALS - denominada biótipo suscetível (S) - foi coletada de uma área que nunca recebeu pulverização com herbicidas inibidores da ALS (área do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP). Realizou-se a semeadura dos biótipos R e S da espécie estudada, separadamente, em bandejas com 10 cm de profundidade; as sementes foram posicionadas a 1 cm de profundidade no substrato - uma mistura de solo e matéria orgânica (3:1). As plantas se desenvolveram em casa de vegetação até apresentarem o segundo par de folhas verdadeiras, momento em que se aplicaram os tratamentos.

Os tratamentos e doses aplicadas estão relacionados no quadro 1. Utilizaram-se herbicidas inibidores da ALS (chlorimuron-ethyl e imazethapyr) e o ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico (CPCA) que é inibidor da KARI. Os produtos foram aplicados sobre a parte aérea das plantas com um pulverizador manual, com pressurização por um êmbolo manual e aplicação direta da calda de herbicida.

O ensaio com a ALS foi realizado com base no trabalho de GERWICK et al. (1993), com as seguintes modificações: (a) após 48 h da aplicação dos produtos (inibidores da ALS e KARI), colheram-se as folhas jovens próximas ao meristema apical das plantas,

Quadro 1. Tratamentos utilizados no ensaio de sensibilidade da ALS dos biótipos R e S de *Bidens pilosa* L. ESALQ/USP - Piracicaba (SP)

Tratamentos	mL ou g.100 mL ⁻¹ de H ₂ O ⁽¹⁾
CPCA ⁽²⁾	0,50
Chlorimuron-ethyl ⁽³⁾ + CPCA	0,20 + 0,50
Imazethapyr ⁽⁴⁾ + CPCA	0,25 + 0,50
Testemunha	---

⁽¹⁾ Dose de produto comercial. ⁽²⁾ Nome comercial: CPCA. ⁽³⁾ Nome comercial: Classic. ⁽⁴⁾ Nome comercial: Pivot.

cujos tecidos apresentavam-se em intenso crescimento das plantas R e S, aproximadamente 5 g por tratamento; (b) o material vegetal foi, então, lavado em água corrente e congelado por duas horas; (c) após este período, transferiu-se o material para tubos de ensaio, devidamente identificados, aos quais se adicionou água em volume três vezes maior da biomassa colhida, macerando e deixando repousar por uma hora; (d) após o repouso, removeu-se uma alíquota de 0,5 mL do líquido sobrenadante e a transferiu para novos tubos, onde foi acrescentado 0,1 mL de H₂SO₄ a 5% deixando em repouso por 15 min, convertendo acetolactato à acetoína; (e) adicionou-se, então, 0,5 mL de creatina a 0,5%, agitou-se em Vortex e deixou-se em repouso por 15 min, adicionando-se, a seguir, 0,5 mL de 1-naphtol a 5%, agitando-se novamente em Vortex e deixando-se em repouso por 60 min, em temperatura ambiente; (f) após uma hora, os tubos foram agitados vigorosamente em Vortex e observada a coloração; (g) a concentração de acetoína formada foi quantificada pela centrifugação por 10 min em 10.000 g e medida a absorbância em 530 nm.

Resultados e Discussão

Os dados referentes às leituras de absorbância a 530 nm e o desenvolvimento do complexo colorido pelos biótipos resistentes e suscetíveis das plantas estudadas encontram-se no quadro 2. No biótipo suscetível, devido à sensibilidade da ALS aos herbicidas chlorimuron-ethyl e imazethapyr, o composto rosa é produzido apenas no tratamento com CPCA aplicado isoladamente. Nesse caso, ocorre a inibição apenas da KARI, o que provoca o acúmulo de acetolactato, que é convertido pela ação de H₂SO₄ em acetoína, formando o complexo colorido por causa da reação com 1-naphtol e creatina.

Nos biótipos resistentes houve acúmulo de acetolactato e, portanto, formação de composto rosa, mesmo nos tratamentos em que se utilizou a mistura CPCA + herbicidas inibidores da ALS, devido à insensibilidade desta enzima ao chlorimuron-ethyl e imazethapyr.

Quadro 2. Formação do complexo colorido e valores da leitura de absorvância, a 530 nm, em biótipos resistentes e suscetíveis de *Bidens pilosa* L

Tratamentos	Biótipo resistente		Biótipo suscetível	
	Cor	Leitura	Cor	Leitura
CPCA	Vermelha	1,94	Vermelha	1,80
CPCA + chlorimuron	Rosa	1,61	Marrom	0,4
CPCA + imazethapyr	Rosa	1,73	Marrom	0,7
Testemunha	Marrom	0,0	Marrom	0,0

Quanto maior a quantidade de acetolactato, maior é a atividade da enzima e mais intensa é a cor desenvolvida, proporcionando valores maiores nas leituras de absorvância. Os valores de absorvância, no biótipo resistente, variaram de 1,73 a 1,94.

GERWICK et al. (1993), utilizando CPCA para inibição da KARI, distinguiram claramente os biótipos resistentes e suscetíveis de *Xanthium strumarium* ao herbicida imazaquim. As folhas dos biótipos resistentes acumularam quantidades substanciais de acetoína na concentração de 2-100.000 µM, com platô ocorrendo em 100 µM. Do mesmo modo, SIMPSON et al. (1995) constataram o acúmulo de acetolactato em folhas de *Glycine max* (L) Merrill, *Zea mays* (L), *Amaranthus hybridus* L., *Xanthium strumarium* L. e *Sorghum bicolor* (L) Moench, após a aplicação foliar de 766 g.ha⁻¹ de CPCA.

O bioensaio *in vitro* com a ALS, mediante acumulação diferencial de acetolactato, é um método bastante prático e eficiente no diagnóstico de resistência de plantas aos herbicidas inibidores da ALS.

Conclusão

O mecanismo de resistência de *Bidens pilosa* aos herbicidas inibidores da ALS é resultante de uma insensibilidade da enzima a esses herbicidas.

Agradecimentos

Ao Centro de Biotecnologia Agrícola, da ESALQ/USP, por permitir o uso de suas instalações, em especial à Professora Dr.^a Helaine Carrer; ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA-FILHO, R.; MONQUEIRO, P.A. Resistência cruzada e herbicidas alternativos de controle de biótipos de *B. pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., 1997, Caxambu. Resumos... Caxambu: SBPD, 1997. p.64.

DUMAS, R.; CORNILLON-BERTHAND, C.; GUIGUE JALET, P.; GENI, P.; DOUCE, R.; JOB, D. Interactions of plant acetohydroxy acid isomeroeductase with reaction intermediate analogues: correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects. *Biochemistry Journal*, New York, v.301, n.3, p.813-820, 1994.

EBERLEIN, C.; GUTTIERE, M.J.; BERGES, P.H.; FELLMAN, J.K.; THELL, D.C.; BAERG, R.; BELKNAP, W. Physiological consequences of mutation for ALS inhibitor resistance. *Weed Science*, Champaign, v.47, n.4, p.383-392, 1999.

EBERLEIN, C.; GUTTIERE, M.J.; THILL, D.C.; BAERG, R.J. Altered acetolactate synthase activity in ALS - inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Science*, Champaign, v.45, n.2, p.212-217, 1997.

GAZZIERO, D.P.; BRIGHENTI, A.M.; MACIEL, G.D.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; ADEGAS, F.S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, Botucatu, v.16, n.2, p.117-125, 1998.

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.

HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. [Online]. Disponível na Internet: www.weedscience.com. 6th October, 2000.

HUTCHISON, J.M.; SHAPIRO, R.; SWEESTER, P.B. Metabolism of chlorsulfuron by tolerant broadleaves. *Pesticide Biochemistry Physiology*, Duluth, v.22, p.243-247, 1984.

LOVELL, S.T.; WAX, L.M.; SIMPSON, D.M.; McGLAMERY, M. Using the *in vivo* acetolactate synthase assay for identifying herbicide-resistant weeds. *Weed Technology*, Champaign, v.10, p.936-942, 1996.

MONQUEIRO, P.A. Biologia, manejo e caracterização bioquímica e genética de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS). Piracicaba, 1999. 94p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S.; CHEHADE, A.T.; DITRICH, R.C. Sagitária resistente a herbicidas inibidores da ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 22., 2000. Foz do Iguaçu. Resumos... Londrina: SBCPD, 2000. p.514.
- PONCHIO, J.A. Resistência de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. Piracicaba, 1996. 138p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RAY, T.B. Site of action of chlorsulfuron inhibitor of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, Los Angeles, v.75, p.827-831, 1984.
- SHEN, Y.S.; CHONG, C.K.; CHOI, J.D. Separation and characterization of two forms of acetolactate synthase from etiolated pea seedling. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, New York, v.32, n.4, p.393-398, 1994.
- SIMPSON, D.M.; STOLLER, E.W.; WAX, L.M. An *in vivo* acetolactate synthase assay. *Weed Technology*, Champaign, v.9, n.1, p.17-22, 1995.
- SWEESTER, P.B.; SCHOW, G.S.; HUTCHISON, J.M. Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. *Pesticide Biochemistry Physiology*, Duluth, v.17, p.18-23, 1982.
- VIDAL, R.A. *Herbicidas: mecanismo de ação e resistência de plantas*. Porto Alegre: R.A. Vidal, 1997. 165p.
- WESTERFELD, W.W. A colorimetric determination of blood acetoin. *Journal Biology Chemistry*, Baltimore, v.161, p.495-502, 1945.