

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS DE BIÓTIPOS
RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS DE *Euphorbia*
heterophylla L. (amendoim-bravo)**

André Luís Amaral
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS DE BIÓTIPOS
RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS DE *Euphorbia*
heterophylla L. (amendoim-bravo)**

André Luís Amaral

Orientador: Prof. Dr. Robinson Antônio Pitelli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Abril de 2006

A485e Amaral, André Luís
Estudos Genéticos e Morfológicos de Biótipos Resistentes e Susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) / André Luís Amaral. -- Jaboticabal, 2006
xii, 50 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientador: Robinson Antônio Pitelli

Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério Sena, Ricardo Victória Filho

Bibliografia

1. *Euphorbia heterophylla*. 2. Melhoramento genético. 3. Resistência a herbicidas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.51:632.954

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ LUIS AMARAL – nascido em 30 de setembro de 1970, em Igarapava (SP), filho de Maura Gallo Amaral e Claudine Amaral. Formado em Engenharia Agrônômica pela UNESP – Campus de Jaboticabal em 1999. Realizou estágios de aperfeiçoamento nos departamentos de Engenharia Rural, Biologia Aplicada à Agropecuária, Tecnologia e Laboratório de Biologia de Plantas Daninhas, no mesmo Campus. Apoiado pela FAPESP, iniciou em março de 2003, curso de pós-graduação em nível de mestrado (Agronomia), na área de Genética e Melhoramento de Plantas, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.

Dedicatória

aos meus pais Cláudine e Maura, dedico.

Aos meus irmãos, **ofereço**.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP, pela oportunidade de continuar aprendendo;

Ao Prof. Dr. Robinson Antônio Pitelli, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, pela orientação e amizade;

À Prof^a Dr^a Eliana G. de Macedo Lemos, do Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP pelas imprescindíveis sugestões e colaborações;

Ao Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, do Departamento de Horticultura, pelo incentivo para vencer as dificuldades;

À Prof^a Fabíola Vitti Môro, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, pela colaboração neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Orlando Mauro, do Departamento de Fitotecnia, pela colaboração neste;

A Senhora Karina Gimenes Fernandes, bibliotecária, pela ajuda em vários momentos;

Aos colegas Robinson, Elaine e Luciana, competentes e sugestivos;

À minha companheira Selma, pelo amor, dedicação e paciência em todos os momentos;

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Conceitos sobre resistência de plantas daninhas aos herbicidas.....	17
2.2 Resistência em <i>Euphorbia heterophylla</i>	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção dos biótipos.....	22
3.2 Substrato para crescimento das plantas em vaso	22
3.3 Teste inicial da reação frente à aplicação do imazethapyr	23
3.4 Caracterização genética dos biótipos	23
3.5 Análise de isoenzimas	23
3.6 Análise do DNA.....	25
3.7 Avaliação das características morfológicas e de crescimento das plantas .	26
3.8 Avaliação da atividade fotossintética das plantas	28
3.9 Nutrição mineral das plantas.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Tolerância dos biótipos aos herbicidas	29
4.2 Estudos genéticos.....	29
4.3 Densidade estomática	35
4.4 Absorção de nutrientes.....	36
4.5 Características morfológicas e de crescimento	37
5 CONCLUSÕES	46
6 REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Padrões isoenzimáticos nas três populações de <i>E. heterophylla</i>	30
Figura 2- Dendograma de isoenzimas.....	31
Figura 3- Perfil eletroforético nas três populações de <i>E. heterophylla</i>	32
Figura 4- Dendrograma obtido por RAPD com as três populações de <i>E. heterophylla</i>	34

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 01-	Porcentagens de controle de plântulas de <i>E. heterophylla</i> provenientes de diferentes regiões do Brasil	29
Tabela 02-	Relação dos "primers" utilizados para análise de RAPD, com suas respectivas seqüências	32
Tabela 03-	Densidades de estômatos e de tricomas nas faces superiores e inferiores de folhas de <i>E. heterophylla</i> coletadas em biótipos com diferentes graus de tolerância aos herbicidas inibidores da ALS e provenientes de diferentes regiões do Brasil	35
Tabela 04-	Teores de macronutrientes nas partes aéreas dos três biótipos de <i>E. heterophylla</i> provenientes de diferentes regiões do Brasil.....	36
Tabela 05-	Valores de F obtidos nas análises de variância dos valores de comprimento, largura e área foliar média por folha, número de folhas por vaso, altura média de planta e biomassa seca acumulada por folhas e caule em biótipos de <i>E. heterophylla</i> provenientes de três locais do Brasil e em diferentes épocas de amostragem	39
Tabela 06-	Valores médios da largura de folhas de <i>E. heterophylla</i> em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil	40
Tabela 07-	Valores médios da área foliar de <i>E. heterophylla</i> em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil	41
Tabela 08-	Valores do número de folhas de <i>E. heterophylla</i> por vaso em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 09- Valores de altura média de <i>E. heterophylla</i> por vaso em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil	43
Tabela 10- Valores de biomassa seca acumulada por vaso em folhas de <i>E. heterophylla</i> em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil	44
Tabela 11- Valores de biomassa seca acumulada por vaso em caules de <i>E. heterophylla</i> em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil	45

ESTUDOS GENÉTICOS DE BIÓTIPOS DE *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim bravo)

RESUMO - Estudos laboratoriais foram realizados com o objetivo de estudar a caracterização genética de plantas de *Euphorbia heterophylla*, provenientes de áreas em que a resistência aos herbicidas inibidores da ALS (Acetolactase) estava caracterizada (Santo Ângelo, RS), em processo de desenvolvimento (Sonora, MS) e onde nunca havia sido aplicado herbicida com este mecanismo de ação (Jaboticabal, SP). Testes preliminares comprovaram elevada resistência para as plantas provenientes de Santo Ângelo, moderada resistência para plantas de Sonora e elevada susceptibilidade para plantas provenientes de Jaboticabal. A análise dos resultados através das isoenzimas revelou que existem pequenas diferenças entre as três populações estudadas. A análise do DNA dos indivíduos das diferentes populações através de marcadores moleculares RAPD, permitiu a construção do Dendrograma de Cluster, que mostra uma similaridade mínima de 88% e máxima de 99% entre os diferentes indivíduos, quer pertencentes à mesma população, quer pertencentes às diferentes populações. Tal análise permitiu inferir que, apesar dos indivíduos analisados mostrarem grande similaridade entre si, apresentam variabilidade genética entre os indivíduos e as populações estudadas, de acordo com a conclusão obtida quando da utilização das isoenzimas. Crescendo em condições similares, o biótipo da Santo Ângelo apresentou maior absorção de fósforo em comparação com os demais, e maior absorção de potássio em relação ao biótipo de Jaboticabal. Comparando a densidade estomática, houve diferença estatística entre os três biótipos, sendo maior para o biótipo mais tolerante ao herbicida e menor para o susceptível. Não foi possível estabelecer qualquer relação confiável entre as características morfológicas e de crescimento das plantas e a resistência ao imazethapyr, podendo as diferenças entre estes biótipos serem atribuídas aos mecanismos adaptativos desenvolvidos para o desempenho populacional em suas respectivas regiões de colonização.

Palavras-chave: isoenzimas, marcadores RAPD, plantas daninhas, resistência a herbicidas

GENETIC STUDIES ON BIOTYPES OF *Euphorbia heterophylla*

SUMMARY - Laboratory studies were carried out aim to characterize genetically *Euphorbia heterophylla* plants were collect in three regions. At Santo Ângelo (RS) region this plant is highly resistant to ALS inhibitors herbicides, but moderately at Sonora (MS) and susceptible at Jaboticabal region. Greenhouse tests confirmed the plants reaction in face of imazethapyr spraying. The isoenzymes studies showed small differences between the three populations. The DNA analysis using molecular markers make feasible the Cluster dendrogram showing 88-99% of similarity comparing plants, regardless the plant origin. Besides the high similarity index between the plants, it was possible to determine lower genetic variation in Jaboticabal and Santo Ângelo populations using isoenzymes technique. The nitrogen and potassium contents in the plants shoot was higher in the Santo Ângelo byotipe, although there was no difference between the K contents when the Jaboticabal and Sonora byotipes were compared. The stomata and trichomes densities decreased in the same order of the plant tolerance to herbicide: Santo Ângelo > Sonora > Jaboticabal. None correlation between biotype resistance to imazethapyr and the plant morphology features for the three biotypes studied. The differences in the plant feature may be attributable to the adaptative mechanism of the plant to the regional characteristics they were collected.

Keywords: herbicide resistance, isoenzymes, RAPD markers, weed

1 INTRODUÇÃO

Todos os componentes bióticos dos agroecossistemas estão sujeitos à ação dos fatores ecológicos que atuam sobre as suas distribuições geográficas, as dinâmicas de suas populações e provocam modificações adaptativas que garantem a evolução e sobrevivência das espécies.

As plantas daninhas, importantes componentes bióticos dos agroecossistemas, proporcionam ou condicionam uma série de fatores ecológicos que afetam as culturas agrícolas, interferindo no crescimento, produtividade e qualidade do produto, além de afetar o processo de produção no campo e o processamento pré-industrial.

A competição pelos recursos de crescimento e a alelopatia são os principais efeitos diretos das plantas daninhas sobre as plantas cultivadas. No entanto, elevadas infestações podem facilitar ou prejudicar a ação de outros fatores, atuando como hospedeiras intermediárias de insetos-praga, fitopatógenos, nematóides, ácaros e plantas parasitas. Também são comuns as situações em que as plantas daninhas atuam negativamente na eficácia dos tratamentos culturais, especialmente na colheita. Por estes motivos, as plantas daninhas são controladas para garantir a produtividade da planta cultivada.

Dentre os fatores ecológicos que atuam sobre as plantas daninhas, aqueles relacionados à ação do homem no seu controle talvez sejam os mais importantes na determinação de seu comportamento no agroecossistema. Os métodos de controle são variados, como variados são seus efeitos sobre o comportamento biológico de cada população de planta daninha.

Os métodos empregados no controle em geral constituem fatores ecológicos que as plantas daninhas não enfrentaram de forma sistemática em seu processo evolutivo e, por isso, não criaram mecanismos de adaptação para manter sua integridade biológica frente à ação deles. Constituem os chamados fatores ecológicos não periódicos. Assim acontece com o revolvimento do solo, o fogo, a aplicação de eletricidade e os herbicidas.

No entanto, com a repetição sistemática de um mesmo método de controle sobre uma população de plantas daninhas, o caráter inédito é perdido; os biótipos mais tolerantes, quando existem, são selecionados e passam a enriquecer o banco de sementes para os ciclos subseqüentes. Com a continuidade do mesmo método de controle, a pressão seletiva continua e o perfil genético da população vai mudando paulatinamente e esta população passa a ser menos afetada por aquele. Assim ocorreu com *Echinochloa cruz-galli* (L.) Beauv. na qual a monda selecionou biótipos morfológicamente parecidos com a planta de arroz. Com o tempo, os coletores tinham dificuldade em distinguir as duas espécies durante o processo de monda. Assim, a população desta gramínea infestante sobreviveu e cresceu, ao longo dos tempos.

Com o plantio comercial de plantas de ciclo precoce, as populações de plantas daninhas sofreram seleção de biótipos de ciclo curto visando produzir sementes antes da colheita. Desse modo, o caráter dinâmico dos comportamentos das populações de plantas daninhas, as permitiu se adaptarem às várias práticas adotadas pelo homem no seu controle, inclusive aos herbicidas.

Cada novo herbicida com mecanismo de ação diferenciado constitui um fator ecológico não periódico, completamente inédito na vida das plantas daninhas e têm elevado poder destrutivo no comportamento das populações susceptíveis, com elevadas reduções das taxas de crescimento e de sobrevivência dos indivíduos. É importante salientar que há plantas daninhas que não são afetadas pelo herbicida, sendo consideradas tolerantes. Assim, em termos de reação frente à ação de um herbicida, cada espécie de planta daninha pode apresentar biótipos susceptíveis ou tolerantes.

Uma população é considerada susceptível quando a grande maioria de seus indivíduos pertence ao biótipo susceptível e sofre grandes danos quando recebe a aplicação do herbicida. É considerada tolerante quando a maioria de seus indivíduos pertence ao biótipo tolerante e não é afetada pela aplicação do herbicida.

Uma população pode não apresentar biótipos susceptíveis e sempre ser controlada pelo herbicida. No entanto, há populações que são susceptíveis, mas apresentam indivíduos do biótipo tolerante em baixa freqüência. Este biótipo não é

afetado pela aplicação do herbicida, sobrevive a esta prática cultural e produz descendentes. Com anos sucessivos de aplicação de herbicidas com o mesmo modo de ação, a sub-população de biótipo tolerante cresce e assume a maioria na população da planta daninha. Nesta condição a eficácia do herbicida cai em termos de redução populacional e diz-se que a população é resistente.

Esta situação ocorreu com algumas plantas daninhas no Brasil, incluindo a *Euphorbia heterophylla* L., conhecida como amendoim-bravo. Esta foi selecionada em áreas de soja no Rio Grande do Sul e Paraná pela aplicação da combinação de metribuzin com trifluralin. Nos fins dos anos 80, com a introdução dos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, o amendoim-bravo passou a ter um excelente controle e deixou de ser um grande problema para os sojicultores. Na população de amendoim-bravo havia biótipos resistentes a este modo de ação do herbicida e cinco a seis anos o início das aplicações foram detectadas populações resistentes.

O presente trabalho tem como objetivo estudar três acessos de amendoim-bravo coletados em Santo Ângelo (RS), Sonora (MT) e Jaboticabal (SP), respectivamente em áreas em que a resistência está comprovada, há suspeita de resistência e nunca foi aplicado qualquer herbicida inibidor da síntese de ALS, como são as imidazolinonas. Os acessos serão designados por biótipos e foram estudadas características morfológicas de crescimento e genéticas destas plantas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Euphorbia heterophylla é uma planta com características pioneiras e nativa das regiões tropical e sub-tropical das Américas. Pertence à família Euphorbiaceae e é popularmente conhecida como amendoim-bravo, leiteira e leiteiro. É relatada em níveis expressivos em mais de vinte países e como planta pouco importante em outros 40 países (KISSMANN; GROTH, 1992). Os autores ainda ressaltam que as plantas de amendoim-bravo apresentam reprodução seminífera altamente eficiente e rápido crescimento inicial. Por estas características, o amendoim-bravo pode interferir precocemente na produtividade da cultura da soja (MESCHEDE et al., 2002)

O aumento da importância de *E. heterophylla* como planta daninha ocorreu a partir dos fins dos anos 70, quando foi expressivamente selecionada pelo uso contínuo da combinação dos herbicidas metribuzin e trifluralin na cultura da soja nas regiões produtoras do Paraná e Rio Grande do Sul (PITELLI, 1992). Em meados dos anos 80, várias áreas estavam praticamente impedidas para o plantio de soja por falta de opções para o controle desta planta daninha (PITELLI, informação pessoal).

Com o aparecimento dos herbicidas do grupo das imidazolinonas no final da década de 80, o controle do amendoim-bravo deixou de ser um problema sério para a cultura da soja.

Cinco a seis anos de uso contínuo das imidazolinonas e de outros herbicidas inibidores da síntese da enzima Acetolactato Sintase, começaram a aparecer as primeiras populações de *E. heterophylla* resistentes à este grupo de herbicidas (VIDAL; FLECK, 1977).

Antes de abordar o desenvolvimento das populações resistentes em *E. heterophylla*, é interessante que sejam esclarecidos alguns conceitos a respeito da resistência de plantas daninhas.

2.1 Conceitos sobre resistência de plantas daninhas aos herbicidas

Ryan (1970) realizou o primeiro relato científico de uma espécie de planta daninha resistente a um herbicida. Tratou-se de população de *Senecio vulgaris* resistente a herbicidas do grupo das triazinas. A partir daí uma série de trabalhos foram publicados, acusando populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas em diversos locais do mundo. No Brasil, o primeiro relato de plantas daninhas foi realizado por Christofolleti et al. (1996) estudando uma população de *Bidens pilosa* que ocorria na região de São Gabriel D'Oeste em que herbicidas do grupo da imidazolininas estava tendo dificuldade de controle.

Há bastante confusão entre os termos resistência e tolerância quando se trata da reação de uma planta daninha frente à aplicação de um herbicida. Sobre este assunto Pitelli e Pitelli (2004) apresentou interessante e esclarecedor texto que será transcrito nos próximos parágrafos.

Segundo Pitelli e Pitelli (2004), na realidade, existem dois genótipos básicos de plantas daninhas em relação a um determinado herbicida. (i) genótipo susceptível ou biótipo susceptível: como manifestação fenotípica a planta é afetada de forma drástica pela ação do herbicida aplicado na dose recomendada, sofrendo redução do crescimento ou a morte do indivíduo e (ii) genótipo tolerante ou biótipo tolerante: em sua manifestação fenotípica a planta não é afetada de forma significativa pela ação do herbicida, podendo crescer e frutificar quando recebeu a dose recomendada do produto.

As populações susceptíveis aos herbicidas são aquelas em que a grande maioria das plantas daninhas pertence ao biótipo susceptível e, por isso, sofre grande redução do crescimento ou da densidade populacional quando recebe aplicação do produto na dose recomendada. As populações tolerantes aos herbicidas são aquelas em que a grande maioria das plantas daninhas pertence ao biótipo tolerante e que sobrevive à aplicação do produto na dose recomendada e mantém seu potencial de crescimento (PITELLI; PITELLI, 2004).

Dentro das populações susceptíveis é possível que exista naturalmente indivíduos com tolerância ao herbicida, mas com baixa frequência de ocorrência. Para as populações que desenvolveram resistência aos inibidores da ALS, acredita-se que a frequência inicial do biótipo tolerante fosse de um para cada milhão de indivíduos (CHRISTOFOLLETI; VICTÓRIA, 1994). Com a utilização sistemática do herbicida, estes indivíduos tolerantes não são eliminados. Como as outras plantas daninhas da mesma e de outras espécies são controladas, estes indivíduos selecionados têm a competição inter e intra-específica eliminada e, em consequência, crescem e produzem sementes profusamente. Muitos de seus descendentes terão a mesma característica de tolerância dos pais. Com o tempo de uso deste herbicida, o biótipo tolerante paulatinamente passa assumir maior proporção no banco de sementes da população até atingir a condição em que expressiva maioria dos indivíduos passa a ser do biótipo tolerante. Esta população deixa de ser controlada pelo produto e é considerada uma população resistente na qual a predominância do biótipo resistente foi aumentada artificialmente pela seleção promovida pelo herbicida. Este é um processo reversível, mas esta reversibilidade depende de inúmeros fatores como a competitividade do biótipo tolerante selecionado, do tamanho do estoque de sementes do biótipo susceptível remanescente no solo, das práticas agrícolas empregadas na área e outros (PITELLI; DURIGAN, 2001).

Assim de modo prático, a população tolerante é natural enquanto que a população resistente teve sua estrutura genética alterada pela seleção do herbicida a partir de uma população susceptível. Assim, populações naturais de picão-preto (*Bidens pilosa*) são naturalmente tolerantes a trifluralina e são susceptíveis as imidazolinonas. No entanto, em determinadas regiões em que o uso de inibidores de ALS foi contínuo e prolongado, foi possível a seleção e o crescimento de biótipo tolerante a estes herbicidas formando as populações resistentes (padrão genético da população alterado), que não são mais controladas pelos produtos afins (PITELLI; PITELLI, 2004).

Christofolleti e Victória (1994) publicaram uma excelente revisão sobre conceitos, mecanismos de desenvolvimento e métodos de manejo da resistência em populações

de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Apresentaram os conceitos de populações com resistência cruzada e com resistência múltipla. Populações com resistência cruzada são aquelas que desenvolveram resistência para mais de um princípio ativo dentro do mesmo grupo de herbicidas com igual modo de ação, Populações com resistência múltiplas são aquelas que desenvolveram resistência para princípios ativos incluídos em diferentes grupos de modo de ação,

Em adição Vidal e Fleck (1997) publicaram que o risco da formação de uma população de plantas daninhas resistente a um determinado herbicida depende de dois fatores: (i) a probabilidade da existência de um biótipo tolerante na população original e (ii) a probabilidade do biótipo selecionado apresente “fitness” suficiente para superar os fatores ecológicos limitantes e estabelecer seus indivíduos e descendentes com sucesso.

Vidal e Fleck (1997) ainda destacam a probabilidade da existência de um biótipo resistente na população original depende: (i) da espécie e sua variabilidade genética, (ii) do tamanho populacional da planta daninha e do modo de ação do herbicida utilizado. Os autores apresentam dados mostrando que a freqüência de existência de um biótipo tolerante na população original depende bastante do modo de ação do herbicida

Poucas pesquisas foram realizadas no Brasil sobre resistência de plantas daninhas relacionadas à cultura da soja. Monquero, Christofolleti e Dias (2000) aplicaram diversas doses dos herbicidas imazethapyr, chlorimuron-ethyl e nicosulfuron em amostras de plântulas provenientes de sementes coletadas em áreas com suspeita de resistência aos inibidores da ALS, para as populações de *Amaranthus quitensis* (Argentina, Cordoba) e *Bidens pilosa* (Brasil, Mato Grosso do Sul). O biótipo de *B. pilosa* mostrou diferente graus de resistência aos herbicidas testados, sendo GR50 de 1,49 g/ha para o chlorimuron-ethyl, 1,27 g/ha para o imazethapyr e 20,08 g/ha para o nicosulfuron. Para o *A. quitensis* estes valores foram de 6,8; 2,45 e 23,54 g/ha.

Monquero e Christofolleti (2001) estudando populações de *Amaranthus quitensis* e de *B. pilosa* confirmaram a resistência cruzada envolvendo herbicidas do grupos das sulfoniluréis e imidazolinonas, mas não apresentaram resistência múltipla quando

testados frente aos herbicidas dos grupos dos inibidores do Fotossistema II e dos inibidores da Protox, presente na rota de síntese de clorofila e citocromo.

2.2 Resistência em *Euphorbia heterophylla*

O primeiro relato de população de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da ALS foi publicado por Vidal e Fleck (1997) estudando uma população com dificuldade de controle na região das Missões, Rio Grande do Sul. Esta área vinha utilizando imidazolinonas para o controle do amendoim-bravo há mais de cinco anos. Segundo Maxwell, Roush e Radosevich (1990), as plantas daninhas resistentes aos herbicidas surgem mais facilmente em áreas de monocultura onde há aplicações repetidas de herbicidas com um mesmo modo de ação por vários anos. Este tipo de prática agrícola causa modificações expressivas nas freqüências dos genes das populações controladas pelo produto. Grande parte da região das Missões, no Rio Grande do Sul, tem monocultura de soja como cultura de verão.

Outros autores confirmaram a resistência do amendoim-bravo às imidazolinonas. Gazziero et al. (1998) realizaram experimentos para confirmar a resistência de um biótipo de amendoim-bravo (E-298) proveniente de Cafelândia do Sul (PR) utilizando várias doses dos herbicidas cloransulan, imazethapyr, imazaquin, sulfentrazone e lactofen. O biótipo apresentou diferentes níveis de resistência cruzada entre os herbicidas cloransulan, imazethapyr e imazaquin. O biótipo foi eficientemente controlado pelos herbicidas lactofen e sulfentrazone que não são inibidores da ALS.

Vidal e Merotto (1999) determinaram resistência cruzada em biótipo de *E. heterophylla* proveniente da região de Passo Fundo. O biótipo não foi controlado satisfatoriamente pelos herbicidas; imazethapyr, imazaquin, imazapyr (imidazolinonas), clorimuron-ethyl, nicosulfuron e metsulfuron (sulfoniluréias) flumetsulam (sulfoanilida). No entanto, não apresentou resistência múltipla e foi bem controlado pelos herbicidas inibidores da EPSPS, mimetizadores de auxinas, inibidores do fotossistema I e II e inibidores da Protox.

A herança deste tipo de resistência foi estudada por Vargas, Borém e Silva (2001), os quais observaram que na geração F1 todos os indivíduos pertenciam ao biótipo tolerante e na geração F2 havia segregação e tanto os homocigotos para tolerância e como os heterocigotos sobreviveram à ação do herbicida imazethapyr. Concluíram que a tolerância é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa.

Com o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD, a distância genética entre biótipos de *E. heterophylla* foi estudada por Vasconcelos et al. (2000) em função da presença ou ausência de bandas e variou entre 1 e 39% entre as plantas. A análise de agrupamento gerou dois grupos de biótipos tendo como fatores diferenciais o formato das folhas (estreito ou arredondado) e a ramificação (densa ou normal).

Aparentemente, o desenvolvimento da população do biótipo resistente foi devido à ausência de competição decorrente do controle de outras populações e dos indivíduos susceptíveis dentro da população de *E. heterophylla*, pois os “fitness” do biótipo susceptível e do tolerante são similares. Briguenti et al. (2001) efetuaram análises de crescimento de plantas de amendoim-bravo dos biótipos susceptível e tolerante aos herbicidas inibidores da ALS e não verificaram diferenças entre os parâmetros estudados. Concluíram que os dois biótipos apresentam taxas de crescimento e características de desenvolvimento similares.

Vidal e Trezzi (2000) comparando o crescimento de quatro biótipos de *E. heterophylla*, sendo três comprovadamente tolerantes aos herbicidas inibidores da ALS e um susceptível, verificaram ausência de diferenças entre as Taxas de Crescimento Relativo, não havendo vantagem competitiva para qualquer biótipo. Algumas diferenças observadas em alguns parâmetros de crescimento não puderam ser atribuídas à constituição genética dos biótipos resistentes ou não, mas à origem dos materiais que foi diversa.

Finalmente, a escassa literatura existente sobre um problema tão sério para a cultura da soja no Brasil é mais uma justificativa para a realização deste trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos biótipos

As sementes de *E. heterophylla* foram coletadas em três populações com distintas reações frente à aplicação do herbicida imazethapyr: plantas comprovadamente resistentes ao herbicida na região de Santo Ângelo (RS), plantas com suspeita de desenvolvimento de resistência na região de Sonora (MS) e plantas comprovadamente susceptíveis na região de Jaboticabal (SP) e as plantas originadas de cada região foram chamadas de biótipos, seguidos das duas primeiras sílabas do nome da região de origem. As sementes foram coletadas de plantas com bom aspecto sanitário e nutricional e armazenadas em câmara fria até o momento da semeadura.

3.2 Substrato para crescimento das plantas em vaso

As plantas de *E. heterophylla* foram cultivadas em vasos preenchidos com uma mistura composta de terra (Latossol Vermelho Escuro), substrato Plantmax e areia média nas proporções (2:1:2), acrescida de nitrogênio (200 mg/kg), fósforo (300 mg/kg) e potássio (150 mg/kg). O fertilizante Yoorin-S foi adicionado com fonte de micronutrientes. Em cada vaso foram plantadas 10 sementes e, aos 15 dias após a emergência, foi realizado o desbaste deixando as três plantas com melhor aspecto sanitário e nutricional. Este tipo de substrato foi utilizado com sucesso para o crescimento de plantas de amendoim-bravo em vasos.

3.3 Teste inicial da reação frente à aplicação do imazethapyr

Um teste preliminar foi instalado em condições de casa-de-vegetação para comprovação da reação das plantas frente à aplicação do imazethapyr. As plantas foram cultivadas em vasos de cinco litros e aplicação ocorreu quando a maioria das plantas iniciava a emissão da segunda folha verdadeira. O produto foi aplicado nas doses de 0,15 e 0,30 Kg/ha utilizando o Pivot (BASF) como produto comercial. A aplicação foi efetuada com pulverizador costal pressurizado a CO₂, munido de dois bicos albu-verde e mantendo um consumo de 200 L/ha de calda. A aplicação foi realizada entre 17h30min e 18h, em ambiente coberto, temperatura de 23,4^o C e 65% de umidade do ar.

3.4 Caracterização genética dos biótipos

Para caracterização genética das populações foram conduzidos 13 vasos de quatro litros para cada biótipo, sendo mantida apenas uma planta por vaso como forma de padronização de tamanho das plantas. As folhas foram coletadas aos 72 dias após a semeadura.

3.5 Análise de isoenzimas

A extração de proteínas foi feita com base na metodologia proposta por Sun e Ganders (1990). Para a análise de isoenzimas, o extrato vegetal foi submetido a uma eletroforese em gel contínuo de poliacrilamida 8%, em condições não desnaturantes, em sistema para mini-gel Mini Protean II (Bio-Rad), gel de 1,5 mm, sendo o gel obtido através da mistura de 1,78 mL de Tris-HCl (2,25 M; pH 8,8), 2,86 mL de Acrilamida/Bis-acrilamida (30:0,8%), 5,93 mL de água deionizada, 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (10%). Foram colocados 20 µL de extrato vegetal em cada

canaleta, adicionando-se tampão de eletrodo (1,5 g de Tris, 7,1 g de Glicina, água suficiente para completar 1 L, pH 8,8) e submetendo-se o sistema a uma tensão constante de 200V, por aproximadamente 50 minutos, sendo o sistema colocado no gelo para evitar aquecimento e conseqüente desnaturação das proteínas (LEMOS et al., 1992). Após a eletroforese, o gel foi submetido à coloração para diferentes sistemas de isoenzimas (PASTEUR et al., 1988).

Esterases (EST-EC 3.1.1.1): O gel foi incubado em 50 mL de Tampão Fosfato 0,1 M, pH 6,2 por 30 minutos, com agitação constante. O tampão foi descartado e adicionado mais 50 mL deste por mais 5 minutos. O tampão foi novamente descartado, submetendo-se o gel à coloração por aproximadamente uma hora no escuro com a seguinte solução: 50 mL de Tampão Fosfato; 50 mg de Fast Blue RR, 30 mg de Ó-noffil acetato e 20 mg de Ó-noffil acetato (estes dois últimos previamente dissolvidos em 0,5 mL de acetona). Quando as bandas apareceram, foi substituída a solução de coloração por 300mL da solução de Etanol (30%) e Ácido Acético (5%).

Álcool Desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.1): Os géis foram incubados na seguinte solução: 20 mL de Etanol (95%), 20 mg de NAD⁺, 20 mg de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide), 2 mg de PMS (Phenazine Methosulfate), completando o volume para 100 mL com Tris-HCl (0,2 M; pH 8,0), no escuro a 37°C de 15 a 60 minutos. Após o aparecimento das bandas, o corante foi descartado e fixado em solução aquosa de Glicerol (10%).

Superóxido Dismutase (SOD-EC 1.15.1.1): O gel foi incubado no claro, por 15 minutos, com agitação, na seguinte solução: 40 mL de Tris-HCl (0,2 M; pH 8,0), 0,2 mL de MgCl₂ e 10 mg de NAD⁺. Em seguida foram adicionados 10 mg de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) e 5 mg de PMS, dissolvidos em 1 mL de água deionizada, deixando-se em agitação no claro. Após o aparecimento das bandas, o corante foi descartado e o gel fixado em solução aquosa de Glicerol (10%).

Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH-EC 1.1.1.49): O gel foi incubado no escuro a 37°C com a solução: 200 mg de Glucose-6-Fosfato, 20 mg de NADP, 20mg de MTT, 2 mg de PMS, 1 mL de MgCl₂ (1%), tampão Tris-HCl (0,2 M, pH 8,0) para

completar 100 mL. As bandas surgiram após 30 a 60 minutos. Após isso, o corante foi descartado e o gel fixado em solução aquosa de Glicerol (10%).

Glutamato Desidrogenase (GDH-EC 1.4.1.3): O gel foi incubado em 20 mL de Ácido L-glutâmico (1 M, pH 8,0), 20 mg de NAD⁺, 20 mg de MTT, 2 mg de PMS, 2 mL de CaCl₂ (1%), completando o volume para 100 mL com Tris-HCl (0,1 M; pH 8,0), no escuro a 37°C por 30 a 120 minutos. Após o aparecimento das bandas, o corante foi descartado e o gel fixado em solução aquosa de Glicerol (10%).

3.6 Análise do DNA

A extração do DNA foi baseada no método proposto por Saghai-Marroof, Soleman e Allard (1984). O DNA de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de tampão TE livre de DNA, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A leitura a 260 nm mostra a quantidade de ácido nucléico na amostra.

Amplificação do DNA genômico (RAPD-PCR): Em um tubo tipo Eppendorf previamente estéril, foram colocados 20 ng de DNA genômico, 2 mL de tampão de PCR (GIBCO) 1X, MgCl₂, 1,5 mM, 0,100 µM de cada dNTP, 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (GIBCO), 1,5 ng “primer”, água milli Q filtrada q.s.p. 20 µL.

Os tubos foram colocados em um aparelho termociclador (PTC-100 Programable Thermal Controler – MJ Reserch, Inc.) e submetidos a um ciclo de: passo1: 94°C por 1 minuto; passo 2: 92°C por 1 minuto; passo 3: 35°C por 1 minuto; passo 4: 72°C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos a partir do passo 2 até o 4; passo 6: 72°C durante 5 minutos. As amostras amplificadas foram mantidas à temperatura de 4°C até serem submetidas à eletroforese.

Foram avaliados “primers” de 10 pares de bases fornecidos pela The University of British Columbia e Operon Technology.

Eletroforese: Em cada tubo contendo 20 µL do DNA amplificado, foram adicionados 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol, 0,01%; glicerol 40%; água

Milli Q estéril 59,99%-qsp 1,0 mL). Desta mistura, 10 µL foram colocados nas canaletas de gel de agarose 1,5% (1,5%, dissolvida em TEB 1X-Tris 28 mM, ácido bórico 88mM, EDTA 7 mM, pH 8,3) e submetidas à eletroforese horizontal no sistema Horizon 11-14 (Gibcco BRL), com uma tensão de 80V por aproximadamente 2 horas. Foram adicionados 8µL de Brometo de etídio no gel antes de vertê-lo na cuba e 10 µL no tampão de eletrodo (TEB 1X, aproximadamente 1 litro). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o “ladder” de 1 Kb (GIBCO).

A visualização dos resultados das amostras, após a eletroforese, foi realizada em equipamento de fotodocumentação (Gel Doc-1000 – Bio Rad) e gravada para análises posteriores.

Para a elaboração da matriz de similaridade de isoenzimas, a partir do gel, tomou-se a medida da distância da canaleta onde foi aplicada a amostra até o centro de cada banda. A esta distância dá-se o nome de “relative front” (rf). Com estes dados o programa QUANTITY ONE compara com os rfs de cada banda de cada gel (dentro de cada canaleta) e constrói uma matriz de similaridade genética. Com base nesta matriz foi escolhido o coeficiente de agrupamento, no caso UPGMA, e os resultados obtidos foram submetidos ao coeficiente de DICE. Gerou-se um dendrograma, onde é possível observar os grupos formados pelos indivíduos de cada população e sua respectiva similaridade.

3.7 Avaliação das características morfológicas e de crescimento das plantas

Para os estudos das características morfológicas e de crescimento dos biótipos de amendoim-bravo, as plantas foram cultivadas em vasos de quatro litros. As sementes foram esterilizadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (5,0%) e depois colocadas para germinação em caixas ger-box com papel de filtro Whatman no 1 úmido. Depois de quatro dias à temperatura ambiente, grande parte das sementes havia emitido a radícula. Para transplante nos vasos definitivos foram consideradas as

sementes com radícula entre um e três milímetros. Foram plantadas de cinco a seis sementes por vaso. No desbaste realizado aos sete dias após a emergência foram deixadas as três plantas que apresentaram o melhor aspecto sanitário e nutricional.

As plantas cresceram em condições de casa-de-vegetação e a irrigação diária foi suficiente para que não houvesse restrição hídrica para o crescimento do amendoim-bravo.

Os 84 vasos contendo três biótipos (28 cada) foram distribuídos em esquema experimental inteiramente casualizado. Aos 07, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a emergência das plantas foram amostrados quatro vasos para avaliação dos dados de crescimento e as características morfológicas.

Na avaliação de crescimento, as plantas foram inicialmente avaliadas quanto ao número de folhas e, depois, separadas em raiz, caule e folhas. A medição da área foliar foi realizada por meio de um "Leaf Área Meter" LI3000. Foram medidas todas as folhas das plantas. Este aparelho fornece para cada folha, os dados de área foliar, máxima largura do limbo e o comprimento ao longo da nervura principal. Foram utilizados apenas os termos largura e comprimento de folhas para facilitar as discussões. Antes da secagem, as partes da planta foram lavadas com critérios para análise de macronutrientes segundo recomendações contidas em Sarruge e Haag (1977).

O comprimento do caule foi obtido por meio de régua graduada em milímetros utilizando, como critério, a distância entre o colo e o ponto de inserção da folha mais recente.

O peso da matéria seca de raízes, caules e folhas foram determinados após secagem em estufa de renovação forçada de ar na temperatura de 50° C (FANEM Modelo 330).

3.8 Avaliação da atividade fotossintética das plantas

As avaliações foram efetuadas nas mesmas datas para estudo das características morfológicas. Antes do corte das plantas para as avaliações, a relação Fv/Fm foi realizada utilizando um detector de fluorescência Hansatech Ltd., modelo Plant Efficiency Analyser (PEA) com luz composta por seis diodos emitindo luz de alta intensidade (LEDs).

3.9 Nutrição mineral das plantas

A biomassa seca das plantas coletadas na sétima semana do ciclo da planta daninha foi moída em micro-moinho tipo Wiley. Apenas foram utilizadas as folhas e os caules, pois é bastante difícil uma limpeza satisfatória das raízes. Os materiais moídos de folhas e caules de cada vaso foram misturados.

A análise de nitrogênio total foi realizada pelo método do semi-microkjeldhal e a do fósforo pela metodologia do ácido fosfovanadato-molibidco, descritos em Sarruge e Haag (1977). Para as determinações de cálcio, potássio, magnésio os materiais sofreram digestão nítrico-perclórica e foram avaliados por espectrofotometria de absorção atômica, seguindo instruções de Jorgensen (1977). O enxofre foi determinado pelo método turbidimétrico, descrito por Vitti (1989).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tolerância dos biótipos aos herbicidas

O teste preliminar para análise das reações das plantas frente à aplicação do imazethapyr (Tabela 01) mostra que o biótipo coletado em Santo Ângelo (RS) apresentou elevado grau de resistência ao produto, enquanto o biótipo coletado em Sonora (MS) apresentou uma menor proporção de plantas que toleraram a aplicação do herbicida. As plantas coletadas em Jaboticabal apresentaram elevada susceptibilidade ao produto. A presença de populações de *E. heterophylla* resistentes aos inibidores da ALS no Rio Grande do Sul já havia sido relatada por Vidal et al. (1997) e Vidal e Merotto (1999). O comportamento similar observado frente às doses de 0,15 e 0,30 Kg/ha nas plantas provenientes de Sonora e Jaboticabal são coerentes com a constatação de Vargas, Borém e Silva(2001) de que esta resistência tem herança nuclear com dominância total.

Tabela 01 – Porcentagens de controle de plântulas de *E. heterophylla* provenientes de diferentes regiões do Brasil

População	Dose do imazethapyr	
	0,15 kg/ha	0,30 kg/ha
Jaboticabal (SP)	100%	98,3%
Sonora (MS)	54,5%	52,1%
Santo Ângelo (RS)	3,3%	1,7%

4.2 Estudos genéticos

Os padrões isoenzimáticos das três populações de *E. heterophylla* L. são mostrados na Figura 1. Os padrões das seis isoenzimas revelam que existem pequenas diferenças entre as três populações obtidas das regiões de Jaboticabal (JA), Santo Ângelo (SA), e Sonora (SO).

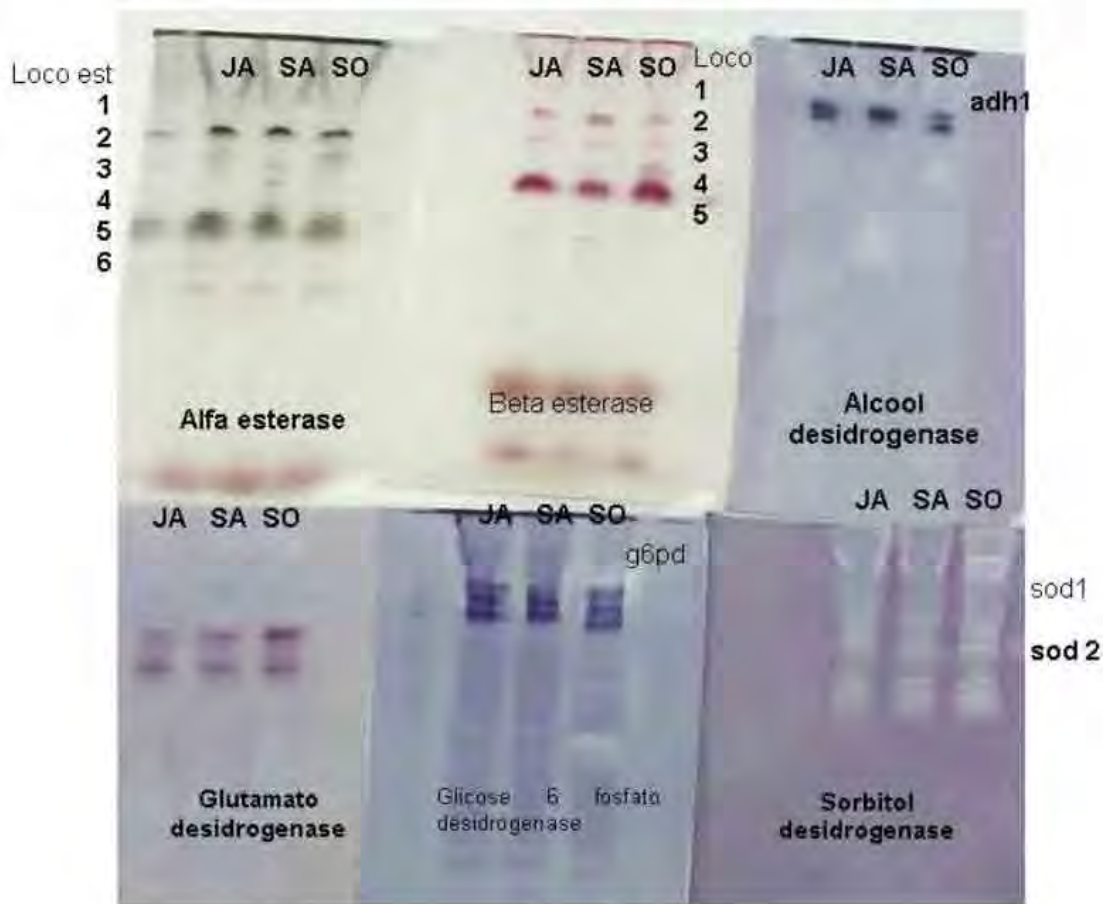


Figura 1. Padrões isoenzimáticos nas três populações de *E. heterophylla*

A observação cuidadosa destes resultados permite inferir que a população da região de Santo Ângelo (SA) é a que apresenta menor índice de similaridade, quando comparada com as demais populações.

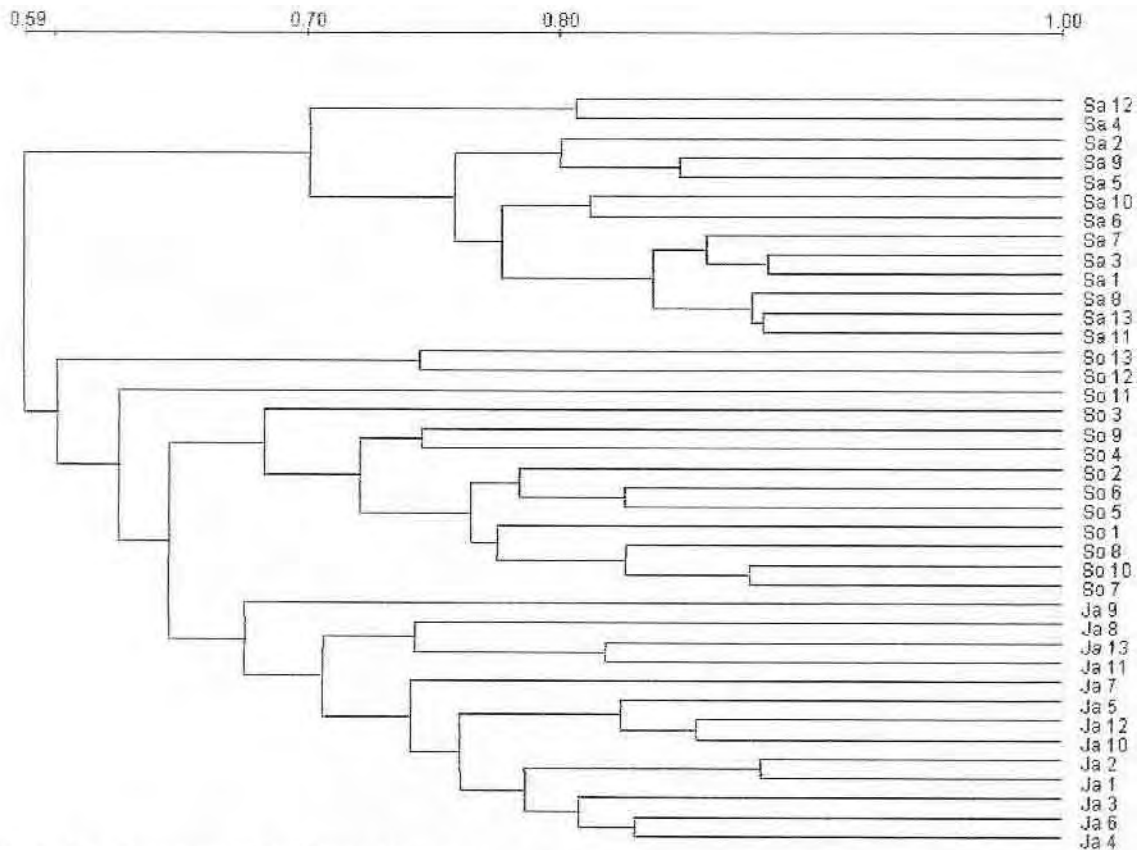


Figura 2: Dendrograma de Isoenzima

Constata-se que na figura 2, ocorre um agrupamento das populações das regiões de Sonora (SO) e Jaboticabal (JA), sendo observadas variações entre os indivíduos de uma mesma população. Na população de Sonora estas variações foram maiores, enquanto que nas outras duas populações os indivíduos mantinham índice de similaridade de no mínimo 70%. Na população de Sonora estes índices foram da ordem de 60%.

É importante observar que a alteração do perfil genético da população de Sonora está em curso como consequência da pressão de seleção exercida pelo herbicida, enquanto que nas populações de Jaboticabal e de Santo Ângelo a uniformidade das pressões de seleção é mais antiga. Deve-se ressaltar que as imidazolinonas são

aplicadas na região de Santo Ângelo desde 1988, quando foi liberado o registro do herbicida imazaquin.

O emprego da técnica RAPD demonstrou a existência de diferença genética no material em estudo. Dentre os 120 "primers" utilizados, apenas quatro proporcionaram eficiência na amplificação das amostras (Tabela 02). Constatou-se que a maioria dos "primers" não amplificou todas as amostras, indicando que estas não apresentam uma região de homologia com tais "primers". Os "primers" selecionados geraram bandas, onde apenas as bandas intensas foram analisadas.

A análise do DNA dos indivíduos das diferentes populações por marcadores RAPD (Figura 2) permitiu a construção do dendrograma da Figura 3. Este dendrograma mostra uma similaridade mínima de 88% entre os diferentes indivíduos e uma similaridade máxima de 99%.

Tabela 02 - Relação dos "primers" utilizados para análise de RAPD, com suas respectivas seqüências.

"PRIMER"	SEQUÊNCIA (5' - 3')
OPB-04	GGACTGGAGT
OPC-09	CTCACCGTCC
OPD-03	GTCGCCGTCA
OPD-15	CATCCGTGCT

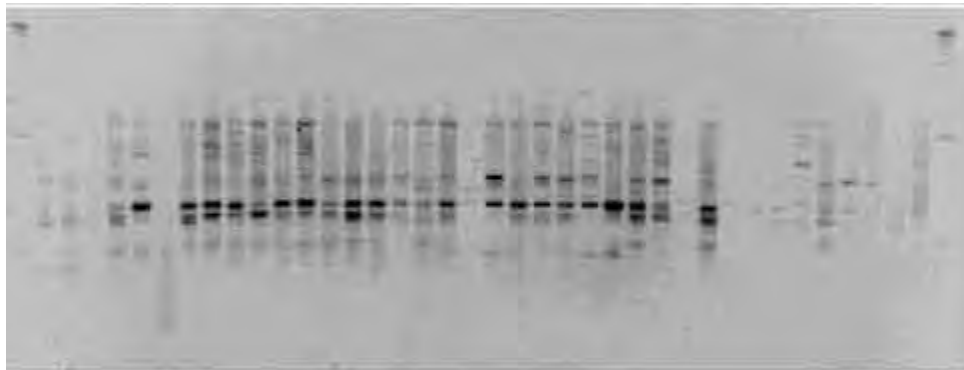


Figura 3: Perfil eletroforético nas três populações de *E. heterophylla* L.

O indivíduo JA-6 mostrou a menor similaridade (88%) com os demais indivíduos. Já os indivíduos JA-11 e JA-5 mostraram um máximo de similaridade de 99%, o que

também foi obtido pelos indivíduos SO-3 e SA-13, entre SO-7 e SA-7 entre SO-5 e JA-1. Os demais indivíduos mostraram graus de similaridade variando entre estes valores.

Estes resultados permitem inferir que apesar dos indivíduos analisados serem similares entre si, há variabilidade genética entre indivíduos e as populações, não sendo possível agrupar os mesmos, segundo sua origem geográfica. A variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população é devido ao fato de ser uma espécie alógama, permitindo assim um constante fluxo de caracteres entre indivíduos de diferentes populações, o que explica a distribuição dos mesmos no dendrograma.

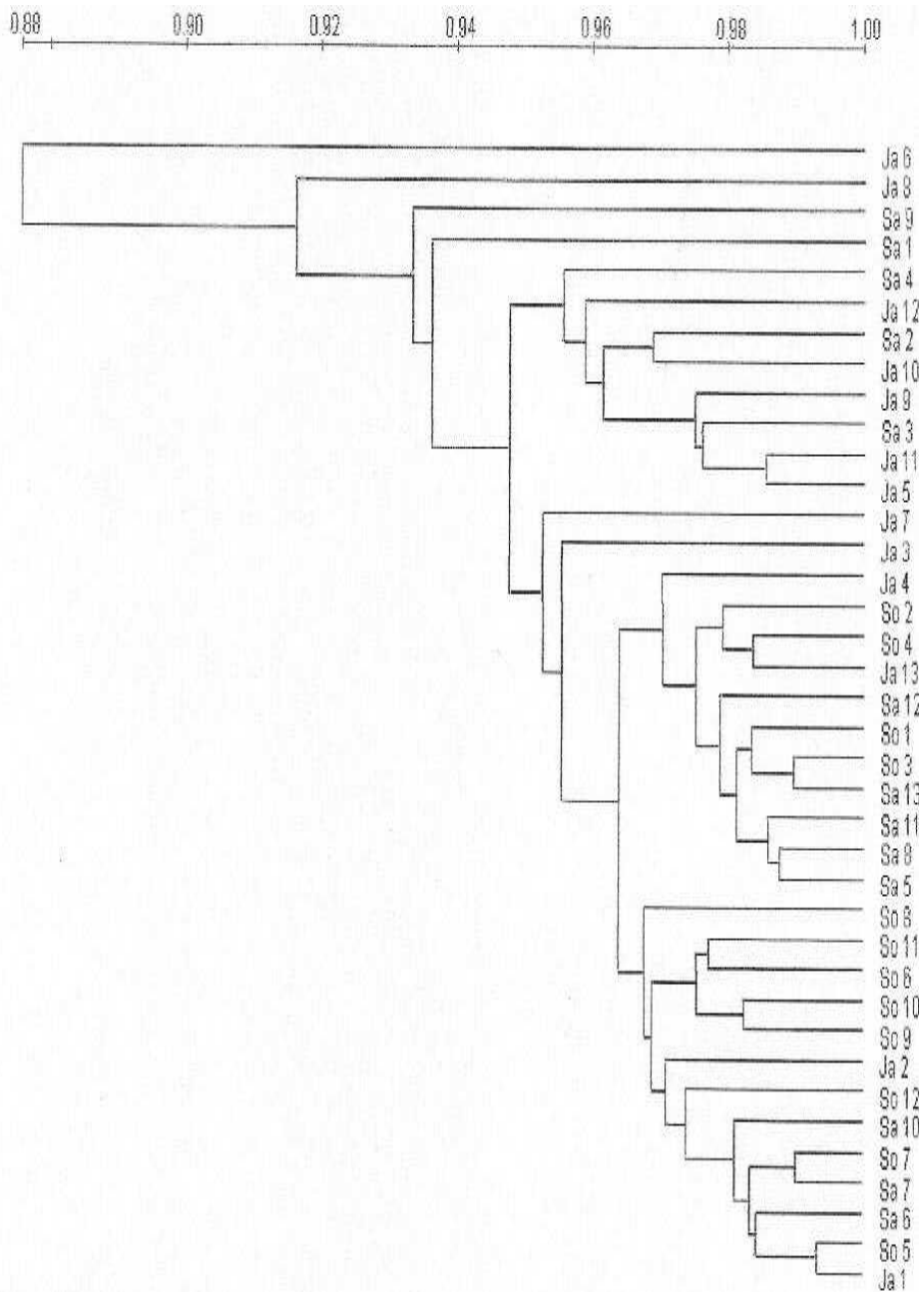


Figura 4. Dendrograma obtido por RAPD com as três populações de *E. heterophylla*

Ocorre um agrupamento das populações das regiões de Sonora (SO) e Jaboticabal (JA). Entretanto, variações entre os indivíduos de uma mesma população foram observadas. Na população de Sonora estas variações foram maiores, enquanto

que nas outras duas populações os indivíduos mantinham índice de similaridade de no mínimo 88%.

4.3 Densidade estomática

Na Tabela 03 estão apresentados os valores médios dos dados de densidades estomáticas nas faces superiores e inferiores e número de tricomas nas folhas dos biótipos estudados.

Tabela 03 - Densidades de estômatos e de tricomas nas faces superiores e inferiores de folhas de *E. heterophylla* coletadas em biótipos com diferentes graus de tolerância aos herbicidas inibidores da ALS e provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Biótipo	Face da folha		Tricomas
	Superior	Inferior	
JA	35.90 b ⁽¹⁾	54.67 c	4.53 c
SA	63.76 a	66.70 a	9,00 a
SO	60.30 a	61.83 b	7.13 b
F	124.07	20.38	30.06
P>0	<0,01	<0,01	<0,01

(1) médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (Tukey 5%)

Os biótipos também variaram com relação à densidade estomática e de tricomas nas folhas. As maiores densidades estomáticas foram observadas no biótipo de Santo Ângelo, que suplantou estatisticamente as densidades dos demais biótipos para ambas as faces da folha.

Para a densidade estomática na face superior das folhas não houve diferença estatística entre os valores observados para os biótipos de Jaboticabal e de Sonora. Na face inferior das folhas o biótipo de Jaboticabal apresentou menor número de estômatos quando comparado com o biótipo de Sonora.

Para a densidade de tricomas, os valores foram maiores no biótipo de Santo Ângelo, seguido do biótipo de Sonora e, por fim, o de Jaboticabal.

Sem dúvida alguma, os biótipos com resistência aos herbicidas inibidores da ALS apresentaram maiores densidades de estômatos e de tricomas, proporcional ao grau de resistência. No entanto, é bastante difícil estabelecer uma relação de causa-efeito pela origem distinta dos materiais botânicos. Estes biótipos estão adaptados às condições regionais e estas características podem ser adaptações à fatores distintos ao herbicida. Uma idéia interessante é estudar dentro de cada área as variações destas características foliares e relacioná-las com o grau de tolerância aos herbicidas inibidores da ALS.

4.4 Absorção de nutrientes

Na Tabela 04 estão apresentados os valores dos teores de macronutrientes na parte aérea dos três biótipos de *E. heterophylla*. A análise de variância não acusou diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os teores de nitrogênio, cálcio e magnésio dos três biótipos.

Tabela 04 - Teores de macronutrientes nas partes aéreas dos três biótipos de *E. heterophylla* provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Biótipo	N	P	K	Ca	Mg	S
JA	28.52 a	0.41 c	15.90 b	9.32 a	1.40 a	1.84 b
SA	31.10 a	0.47 b	21.30 a	10.57 a	1.50 a	2.38 a
SO	31.00 a	0.49 a	16.92 b	10.65 a	1.52 a	2.06 ab
F	0.955	43.00	116.23	4.720	1.800	11.060
P>0	0.421	>0.01	>0.01	0.040	0.220	0.004

(1) médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (Tukey 5%)

Para o enxofre, embora a análise de variância não detectasse diferença estatisticamente significativa entre os biótipos, o teste de comparação de média (Tukey) mostrou que os teores deste elemento foram maiores para o biótipo de Sonora quando comparado com o de Jaboticabal.

Para o fósforo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três biótipos. O maior teor foi observado no biótipo de Sonora e o menor no Jaboticabal. Os teores de potássio na parte aérea, foram estatisticamente maiores no biótipo de Santo Ângelo, quando comparados com os outros dois.

4.5 Características morfológicas e de crescimento

Na Tabela 05, estão apresentados os valores de F obtidos nas análises de variância dos dados referentes às médias do comprimento, largura e superfície da folha; número de folhas por vaso, altura média da planta e peso da matéria seca acumulada em folhas e caules das plantas de *E. heterophylla*. Para todas as características das plantas, foram significativos os efeitos da época de amostragem e biótipo da planta daninha. Com exceção do comprimento médio das folhas, os efeitos das interações entre as variáveis foram significativos para os demais parâmetros da referida tabela.

O comprimento da folha cresceu durante todo o período experimental de maneira similar para todos os biótipos (inferido pela não significância da interação) e o biótipo de Santo Ângelo apresentou folhas com menor média de comprimentos, quando comparados com os biótipos de Jaboticabal e Sonora.

O desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos da análise de variância dos dados de largura média da folha, estão apresentados na Tabela 06. Considerando que não é o objetivo do presente trabalho analisar o crescimento dentro de cada biótipo, não serão discutidas as diferenças entre os valores observados em diferentes épocas de amostragem dentro de cada origem.

Apenas aos 30 dias após a semeadura, não houve diferença entre as larguras médias da folhas de diferentes cultivares. Aos 37 e 44 dias, o biótipo de Sonora apresentou largura média de folha superior aos outros dois biótipos. Aos 51 dias, o biótipo de Sonora apresentou largura média de folha superior apenas à do biótipo de Jaboticabal. Nas avaliações realizadas aos 58 e 65 dias, a largura média de folha do

biótipo de Sonora foi superior apenas ao de Santo Ângelo. Aos 72 dias, o valor observado no biótipo de Jaboticabal suplantou estatisticamente ao observado no biótipo de Santo Ângelo.

Tabela 05 - Valores de F obtidos nas análises de variância dos valores de comprimento, largura e área foliar média por folha, número de folhas por vaso, altura média de planta e biomassa seca acumulada por folhas e caule em biótipos de *E. heterophylla* provenientes de três locais do Brasil e em diferentes épocas de amostragem.

Variáveis	Comprimento médio de folha	Largura média de folha	Área foliar média	Número de folhas/vaso	Altura média de planta	Biomassa seca	
						Folhas	Caulis
Época (E)	31,62**	94,39**	20353,32**	251,76**	44848,85**	71239,23**	78039,98**
Biótipo (B)	13,95**	27,55**	2168,29**	48,17**	750,67**	136,85**	2797,65**
Interação E x B	1,00 ^{NS}	4,43**	156,27**	13,42**	209,18**	711,32**	348,39**
Efeito de Época (DAS)							
30 DAS ⁽¹⁾	5,99 D	3,76 E	0,75 F	11,67 E	29,30 G	3,53 G	3,84 G
37 DAS	7,42 C	4,37 D	0,96 E	11,67 E	45,23 F	5,11 F	5,76 F
44 DAS	8,51 B	4,97 C	1,23 D	12,33 E	61,33 E	8,03 E	13,60 E
51 DAS	8,41 B	5,00 C	1,32 C	15,33 D	69,33 D	8,59 D	19,56 D
58 DAS	8,85 AB	5,47 B	1,33 C	17,67 C	79,43 C	9,15 C	30,20 C
65 DAS	9,18 AB	5,63 AB	1,39 B	18,67 B	82,43 B	11,39 B	35,94 B
72 DAS	9,46 A	5,84 A	1,47 A	19,92 A	84,80 A	13,47 A	40,40 A
Efeito de Biótipo							
Jaboticabal	8,75 A	4,91 B	1,21 B	15,39 B	66,03 A	8,51 A	23,22 A
Sonora	8,73 A	5,30 A	1,26 A	16,29 A	62,60 C	8,35 B	21,13 B
Santo Ângelo	7,70 B	4,80 B	1,15 C	14,29 C	65,03 C	8,53 A	19,64 C
C.V%	8,90	5,25	0,52	4,99	0,53	0,52	0,84

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns = não significativo pelo teste, com critério de 5% de probabilidade ; (1) dias após a semeadura

Considerando que não houve efeitos da interação para o comprimento médio de folha, pode-se inferir que o biótipo de Sonora apresentou folhas de formato mais pruniforme e o cultivar de Santo Ângelo mais alongado, especialmente em fase mais adiantada do ciclo da planta.

Tabela 06 – Valores médios da largura de folhas de *E. heterophylla* em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil.

Época de amostragem	Biótipo		
	Jaboticabal	Sonora	Santo Ângelo
30 DAS ⁽¹⁾	3,90 a ⁽²⁾	3,78 a	3,60 a
37 DAS	4,09 b	4,80 a	4,20 b
44 DAS	4,40 b	5,70 a	4,80 b
51 DAS	4,80 b	5,30 a	4,90 ab
58 DAS	5,40 ab	5,80 a	5,20 b
65 DAS	5,70 ab	5,90 a	5,30 b
72 DAS	6,11 a	5,80 ab	5,60 b

(1) dias após semeadura; (2) médias acompanhadas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%

Na Tabela 07, estão apresentados os valores da área foliar média obtidos no desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos. Com exceção da amostragem realizada aos 30 dias após a semeadura, em todas as outras épocas de amostragem, a área média das folhas de *E. heterophylla* foi maior no biótipo de Sonora, quando comparado com os provenientes de Jaboticabal e Santo Ângelo. Na amostragem realizada aos 30 dias, a área foliar do biótipo de Jaboticabal foi estatisticamente semelhante ao de Sonora e ambos foram superiores à área foliar do biótipo de Santo Ângelo.

Após a amostragem realizada aos 30 dias após a semeadura, a área foliar média do biótipo de Santo Ângelo apenas suplantou à do biótipo de Jaboticabal aos 44 dias após a semeadura. Em todas as demais amostragens, os valores observados para o biótipo de Jaboticabal foram significativamente superiores aos verificados para o biótipo de Santo Ângelo.

Considerando as três características morfológicas examinadas para as plantas de *E. heterophylla*, não foi constatada qualquer relação evidente com a resistência ao imazethapyr apresentada pelos biótipos. Os maiores valores de área foliar e largura média de folhas foram observados no biótipo de Sonora, que apresenta resistência intermediária ao herbicida. Os menores valores foram observados no biótipo de Santo Ângelo, que possui mais elevado grau de resistência.

Tabela 07 – Valores médios da área foliar de *E. heterophylla* em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil.

Época de amostragem	Biótipo		
	Jaboticabal	Sonora	Santo Ângelo
30 DAS ⁽¹⁾	0,80 a	0,81 a	0,64 b
37 DAS	0,96 b	1,01 a	0,91 c
44 DAS	1,16 c	1,30 a	1,23 b
51 DAS	1,31 b	1,41 a	1,25 c
58 DAS	1,32 b	1,36 a	1,31 c
65 DAS	1,40 b	1,45 a	1,32 c
72 DAS	1,49 b	1,51 a	1,39 c

(1) dias após semeadura; (2) médias acompanhadas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%

Na Tabela 08, estão apresentados os valores dos números médios de folhas por vaso, obtidos no desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos. Nas três primeiras avaliações (30, 37 e 44 dias após a semeadura) não houve diferença estatística entre o número de folhas produzidas pelos três biótipos estudados. A partir desta data de avaliação, sempre o biótipo de Sonora apresentou o maior número de folhas e apenas foi estatisticamente similar ao biótipo de Jaboticabal na última data de amostragem. Na amostragem realizada aos 51 dias após a semeadura, o número de folhas do biótipo de Jaboticabal foi superior ao de Santo Ângelo. Nas avaliações de 58 e 65 dias após a semeadura, ocorreu semelhança estatística entre os números de folhas produzidas pelos biótipos de Jaboticabal e Santo Ângelo.

Estas características foliares estudadas, aparentemente representam características das populações em que foram coletadas as sementes e não correlacionam com o grau de tolerância ao imazethapyr, pois os maiores valores das características foliares foram apresentados pelo biótipo de resistência intermediária e não houve consistência na superioridade de uma característica foliar para o biótipo com maior ou menor resistência ao herbicida: Santo Ângelo e Jaboticabal, respectivamente.

Tabela 08 – Valores do número de folhas de *E. heterophylla* por vaso em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil.

Época de Amostragem	Biótipo		
	Jaboticabal	Sonora	Santo Ângelo
30 DAS ⁽¹⁾	12,00 a	11,00 a	12,00 a
37 DAS	12,00 a	11,00 a	12,00 a
44 DAS	13,00 a	12,00 a	12,00 a
51 DAS	15,00 b	18,00 a	13,00 c
58 DAS	17,00 b	20,00 a	16,00 b
65 DAS	18,00 b	21,00 a	17,00 b
72 DAS	20,75 a	21,00 a	18,00 b

(1) dias após semeadura; (2) médias acompanhadas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%

Na Tabela 09, estão apresentados os valores de altura média das plantas de *E. heterophylla* obtidos no desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos. Na primeira e segunda épocas de avaliação (30 e 37 dias após a semeadura) a maior altura de planta foi observada no biótipo de Santo Ângelo e o menor no biótipo de Sonora.

Tabela 09 – Valores de altura média de *E. heterophylla* por vaso em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil.

Época de Amostragem	Biótipo		
	Jaboticabal	Sonora	Santo Ângelo
30 DAS ⁽¹⁾	31,30 b	23,00 c	33,60 a
37 DAS	45,50 b	41,30 c	48,90 a
44 DAS	63,00 a	60,20 b	60,80 b
51 DAS	70,90 a	68,90 b	68,20 b
58 DAS	81,70 a	78,00 b	78,60 b
65 DAS	84,00 a	81,20 b	82,10 b
72 DAS	85,80 a	85,60 a	83,00 b

(1) dias após semeadura; (2) médias acompanhadas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%

A partir dos 44 dias após a semeadura, o biótipo de Jaboticabal sempre apresentou planta com maior altura em relação aos demais biótipos, com exceção da avaliação realizada aos 72 dias em que houve semelhança estatística entre os biótipos de Jaboticabal e Sonora. Os dois biótipos com resistência ao imazethapyr (Jaboticabal e Sonora) apresentaram a mesma altura de planta nas avaliações realizadas entre 44 e 65 dias após a semeadura. Aos 72 dias após a semeadura a altura das plantas do biótipo de Santo Ângelo foi inferior ao de Jaboticabal. Esta menor altura nos biótipos com algum grau de resistência, pode ser coincidência ou estar relacionado ao processo de tolerância, sendo necessárias pesquisas complementares para qualquer inferência mais segura.

Na Tabela 10, estão apresentados os valores de biomassa seca média acumulada em folhas de plantas de *E. heterophylla* obtidos no desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos. Não há uma consistência dos dados na comparação dos biótipos. Nas avaliações realizadas aos 37, 65 e 72 dias após a semeadura, a biomassa seca acumulada em folhas no biótipo de Jaboticabal suplantou todos os demais biótipos. Nas avaliações realizadas aos 30, 51, 58 dias após a semeadura, este comportamento ocorreu para o biótipo de Sonora, exatamente o oposto em termos de tolerância ao imazethapyr.

Tabela 10 – Valores de biomassa seca acumulada por vaso em folhas de *E. heterophylla* em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil.

Época de Amostragem	Biótipo		
	Jaboticabal	Sonora	Santo Ângelo
30 DAS ⁽¹⁾	3,47 b	3,36 c	3,75 a
37 DAS	5,20 a	5,03 c	5,11 b
44 DAS	8,13 a	7,86 b	8,10 a
51 DAS	8,17 c	8,59 b	9,01 a
58 DAS	8,21 c	9,32 b	9,91 a
65 DAS	12,47 a	10,73 c	10,97 b
72 DAS	13,93 a	13,59 b	12,89 c

(1) dias após semeadura; (2) médias acompanhadas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%

Até os 44 dias após a semeadura, a biomassa seca acumulada em folhas do biótipo de Sonora foi estatisticamente inferior aos demais biótipos. Nas avaliações realizadas aos 51 e 58 dias após a semeadura, o biótipo de Sonora apresentou maior acúmulo de matéria seca em relação ao de Jaboticabal; aos 65 dias voltou a apresentar o menor valor de matéria seca acumulada, e aos 72 dias apresentou valor significativamente maior que o observado para o biótipo de Santo Ângelo.

Outro importante fato a ser ressaltado neste comportamento da planta, é que o biótipo de Sonora apresentou os maiores valores dimensionais de folhas e os menores valores de matéria seca, indicando folhas mais finas ou com menor densidade de tricomas. Como se trata de um biótipo com resistência intermediária ao imazethapyr, provavelmente na há relação entre os dois processos.

Na Tabela 11, estão apresentados os valores de biomassa seca média acumulada em caules de plantas de *E. heterophylla* obtidos no desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos.

Tabela 11 – Valores de biomassa seca acumulada por vaso em caules de *E. heterophylla* em diferentes épocas de amostragem em plantas provenientes das regiões do Brasil.

Época de Amostragem	Biótipo		
	Jaboticabal	Sonora	Santo Ângelo
30 DAS ⁽¹⁾	4,03 a	4,15 a	3,34 b
37 DAS	6,05 a	6,22 a	5,01 b
44 DAS	14,28 ab	14,69 a	11,83 c
51 DAS	20,78 ab	21,11 a	16,79 c
58 DAS	34,79 a	28,33 b	27,48 c
65 DAS	39,14 a	34,65 b	34,03 c
72 DAS	43,48 a	38,75 b	38,97 c

(1) dias após semeadura; (2) médias acompanhadas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%

Até a avaliação realizada aos 51 dias após a semeadura, não houve diferença estatística entre os valores da biomassa seca acumulada em caules dos biótipos de Jaboticabal e Sonora e ambos foram superiores aos valores observados para o biótipo de Santo Ângelo. Nas três últimas avaliações (58, 65 e 72 dias após a semeadura), o biótipo de Jaboticabal apresentou os valores mais elevados de matéria seca de caules e os valores observados para o biótipo de Sonora foram estatisticamente superiores aos de Santo Ângelo.

Não foi possível estabelecer qualquer relação confiável entre as características morfológicas e de crescimento das plantas e a resistência ao imazethapyr, podendo as diferenças entre estes biótipos serem atribuídas aos mecanismos adaptativos desenvolvidos para o desempenho populacional em suas respectivas regiões de colonização. Vidal e Trezzi (2000), trabalhando também com biótipos de *E. heterophylla* do Rio Grande do Sul, também sugeriram que algumas diferenças observadas em alguns parâmetros de crescimento não puderam ser atribuídas à constituição genética dos biótipos resistentes ou não, mas à origem dos materiais que foi diversa.

5 CONCLUSÕES

Nas condições específicas em que foi conduzido o presente trabalho, foi possível concluir que:

- O biótipo coletado em Santo Ângelo (RS) apresentou elevado grau de resistência ao imazetapyr; o biótipo coletado em Sonora (MS) apresentou uma menor proporção de plantas que toleraram a aplicação do herbicida, e as plantas coletadas em Jaboticabal apresentaram elevada susceptibilidade ao produto;
- A análise de RAPD mostrou similaridade mínima de 88% e máxima de 99% entre os diferentes indivíduos, quer pertencentes à mesma população, quer pertencentes às diferentes populações, sem ser possível estabelecer uma relação entre o genótipo e a resistência ao herbicida;
- O biótipo da Santo Ângelo apresentou maior absorção de fósforo, em comparação com os demais, e maior absorção de potássio em relação ao biótipo de Jaboticabal.
- A densidade estomática foi diferente entre os três biótipos, sendo maior para o biótipo mais tolerante ao herbicida e menor para o susceptível.
- Não foi possível estabelecer qualquer relação confiável entre as características genéticas, morfológicas, de crescimento das plantas, e da resistência ao imazethapyr, podendo as diferenças entre estes biótipos serem atribuídas aos mecanismos adaptativos desenvolvidos para o desempenho populacional em suas respectivas regiões de colonização.

6 REFERÊNCIAS

BRIGHENTI, A.M. et al. Análise de crescimento de biótipos de amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 19, n.1, p. 51-59, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P.J. et al. Imidazolinone resistant *B. pilosa* biotypes in the Brazilian soybean areas. In: 1996 MEETING OF THE WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, Norfolk, 1996. **Abstract...** Norfolk, 1996, v. 36, p. 10.

CHRISTOFOLLETI, P.J.; VICTÓRIA FILHO, R. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n.1, p. 13-20, 1994.

GAZZEIRO, D.L. et al. Resistência do amendoim bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, v. 16, n. 2, p. 117-125, 1998.

JORGENSEN, S.S. **Metodologia utilizada para análises químicas de rotina**: guia analítico. Piracicaba: CENA, 1977. 24 p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1992. v. 2, 798 p.

LEMOS, E.G.M. et al. **Eletroforese aplicada à agropecuária**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 45 p.

MAXWELL, B.D.; ROUSH, M.L.; RADOSEVICH, S.R. Predict the evolution dynamics of herbicide resistance in weed population. **Weed Technol.**, v. 4, p. 2-13, 1990.

MESCHEDE, D. K. et al. Período crítico de interferência da *Euphorbia heterophylla* na cultura da soja sob baixa densidade de semeadura. **Planta daninha**, v. 20, n. 3, p. 381-387, 2002.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Manejo de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta daninha**, v. 19, n. 1, p. 67-64, 2001.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DIAS, C.T.S. Resistência de plantas daninhas ao herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta daninha**, v. 18, n. 3, p. 419-425, 2000.

PASTEUR, N. et al. **Practical isozyme genetics**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 215 p.

PITELLI, R.A. Weed-soybean interference studies in Brazil. In: COOPING, L.G.; GREEN, M.B.; REES, R.T. **Pest management in soybean**, London: Elsevier Publishers, 1992. p. 282-289.

PITELLI, R.A.; DURIGAN, J.C. Ecologia das plantas daninhas no sistema de plantio direto. In: ROSSELO, R.D. **Siembra directa en el cono sur**. Procisur: Montevideo, 2001, v. 1, p. 203-210.

PITELLI, R.A.; PITELLI, R.L.C.M. Biologia e ecofisiologia das plantas daninhas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2004. p. 29-55.

RYAN, G.F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. **Weed Sci.** v. 18, p. 614-616, 1970.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLEMAN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribossomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population Dynamics. **PANS**, London, v. 81, p. 8014-8, 1984.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1974. 56 p.

SUN, M.; GANDERS, F.R. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity**, Oxford, n. 64, p.139-143, 1990.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A.A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2001.

VASCONCELOS, M.J.V. et al. Variabilidade genética em biótipos de leiteiro de Londrina/PR. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 285-291, 2000.

VIDAL, R.A. et al. Picão-preto e leiteira resistentes aos inibidores de ALS não apresentam resistência aos herbicidas com diferentes mecanismos de ação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., 1997, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: SBCPD, 1997. 465 p.

VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 15, n. 12, p. 152-161, 1997.

VIDAL, R.A.; MEROTTO JR., A. Resistência do amendoim bravo aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 17, n. 3, p. 367-373, 1999.

VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Análise de crescimento de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 427-433, 2000.

VITTI, G.C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 37 p.