

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANDRÉIA KAZUMI SUZUKAWA

Métodos de discriminação da sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas
chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone

MARINGÁ,
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2019

ANDRÉIA KAZUMI SUZUKAWA

Métodos de discriminação da sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas
chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias na Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Profº. Dr. Alessandro Lucca Braccini

Co-Orientador: Profº. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Junior

MARINGÁ,
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

S968m Suzukawa, Andréia Kazumi
 Métodos de disseminação da sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone / Andréia Kazumi Suzukawa. -- Maringá, PR, 2019. ix, 77 f.: il. color.

 Orientador: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini.
 Coorientador: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Júnior.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

 1. Glycine max (L.) Merrill. 2. Sulfonilureia. 3. Triazolopirimidinas. I. Braccini, Alessandro Lucca, orient. II. Oliveira Júnior, Rubem Silvério de, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 23.ed. 633.34

Márcia Regina Paiva de Brito – CRB-9/1267

ANDRÉIA KAZUMI SUZUKAWA

Métodos de discriminação da sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas
chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do
Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Estadual de Maringá, como requisito para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia

Aprovado em: 25 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini

Universidade Estadual de Maringá (Orientador)

Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Junior

Universidade Estadual de Maringá (Co-orientador)

Dr. Fernando Storniolo Adegas

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Soja

Prof. Dr. Rogério Marchiosi

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Denis Fernando Biffe

Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

A caminhada foi acompanhada de pessoas incríveis que me incentivaram e contribuíram de uma forma imensurável na realização desta tese.

Aos meus pais, Yukiharu Suzukawa e Áurea Massako Ichioka Suzukawa, que são os pilares da minha vida. Muito obrigada pelo apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Álvaro Massamitsu Suzukawa e Marcílio Akio Suzukawa, pela amizade eterna. E à toda família Suzukawa e Ichioka pela motivação e apoio

Ao professor Alessandro Lucca Braccini, pela oportunidade oferecida e a confiança.

Aos professores Rubem Silvério de Oliveira Jr. e Jamil Constantin, meu profundo agradecimento pela orientação, por confiarem em mim neste trabalho, por me “adotarem” e aceitarem no Núcleo de Estudos Avançados em Ciência das Plantas Daninhas (NAPD/UEM). Esta oportunidade foi especial e um privilégio concedido a poucos. Obrigada pelas contribuições no trabalho, pela amizade, apoio e conselhos durante todos estes anos, desde a graduação. São exemplos de profissionalismo, dedicação e competência, serão eternamente meus ídolos.

Aos professores Caio A. Carbonari e Edivaldo D. Velini, a quem tive o imenso prazer de conhecer, de aprender com eles e de conduzir esta tese. Muito obrigada pela oportunidade única e por serem profissionais em quem podemos nos espelhar.

Aos professores Rogério Marchiosi e Osvaldo Ferrarese Filho, por sempre estarem dispostos a ajudar e a compartilhar o grande conhecimento que tem e aos membros da equipe da Bioplan, Rita Siqueira e Érica Hoshino.

Agradeço, em especial, a Luiz Henrique M. Franchini, Denis F. Biffe, Fabiano A. Rios, Vanessa F. V. Silva e Rafael R. Mendes pelo apoio, amizade e parceria na condução deste trabalho.

Ao NAPD e seus membros e egressos, Ricardo T. Raimondi, Naira M. de Freitas, Nicole B. da Riva, Fellipe G. Machado, Willian D. Matte, Mariucélio S. Lima, Lucas M. Padovese, Mateus D. Mattiuzzi, Jonas R. Henckes, Henrique F. Placido, Felipe K. Morota, Ana Karoline S. Sanches, Alexandre Gemelli, Vinícius D. B. Gonçalves, Gustavo D. da Silva, André L. F. Cuba, Vinicius P. Silva, Rodrigo B. Baladeli, Leonardo R. Fernandes, Leandro P. Garcia, Gines O. Peres Neto, João C. Padovese, Leandro R. de Almeida, Murilo D. Pasquini, Rudy Segati Junior, Fernanda P. Vieira e aos funcionários, “seu Bepe” e Cléo. Obrigada pelo auxílio na condução do trabalho, nas trocas de ideias, pelos ensinamentos, pelas risadas, pela amizade.

Em especial, agradeço à Luanna N. A. Rijo, além de ser a secretária-anfitriã do NAPD, sempre disposta a manter o NAPD em ordem, com um trabalho impecável, tornou-se uma grande amiga.

Ao Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) e seus membros José Guilherme F. Cordeiro, José Roberto Marques Silva, Fábio H. Krenchinski, Renato Costa, Vinicius Gabriel e Natália Bevilaqua.

Agradeço meus anjos que Deus enviou na forma de amigos e amigas Vanessa F. V. Silva, Carolina B. Pereira, Mayara M. Garcia, Lucas C. Pereira, Ana Karoline S. Sanches, Larissa V. Correia, Jonas R. Henckes e Rodrigo Contreras-Soto. Agradeço, também, aos demais colegas de mestrado e doutorado; foi uma honra conhecer profissionais qualificados e dedicados.

Ao engenheiro agrônomo, M.Sc. Luís Henrique Penckowski e equipe e à Fundação ABC pela condução dos ensaios preliminares primordiais para esta tese e por compartilhar as valiosas informações.

À Universidade Estadual de Maringá, no Departamento de Agronomia e o Programa de Pós-graduação em Agronomia pela minha formação.

Ao professor Carlos Alberto Scapim, apesar de nem sempre concordarmos, sei que no fundo, procurou me impulsionar a crescer. Agradeço a confiança depositada em mim.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Érika C. T. Sato, pela amizade e o atendimento profissional durante estes anos. O que seria de nós, meros pós-graduandos sem a sua força e seu apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho, o meu mais elevado agradecimento.

EPÍGRAFE

“There is no such thing as a self-made man. We are made up of thousands of others. Every one who has ever done a kind deed for us, or spoken one word of encouragement to us, has entered into the make-up of our character and of our thoughts, as well as our success.”

“Não existe um homem que se fez exclusivamente em função de seus méritos pessoais. Somos feitos de milhares de outros. Todos aqueles que já fizeram alguma coisa por nós, ou nos falou uma palavra de encorajamento, entrou na composição de nosso caráter, de nossos pensamentos, assim como de nosso sucesso.”

(George Matthew Adams)

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Condições cromatográficas para quantificação de chlorimuron-ethyl.	30
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos aminoácidos valina, leucina, isoleucina e o ácido 2-aminobutírico.	30
Tabela 3. Notas de fitointoxicação (%) aos 7 e 14 dias após a aplicação de chlorimuron-ethyl para duas variedades de soja e em quatro doses. Maringá – PR, 2018.	33
Tabela 4. Análise de variância para absorção de chlorimuron-ethyl nas folhas para variedade, coleta e a interação entre os dois fatores. Maringá – PR, 2018.	35

Capítulo 2

Tabela 1. Condições cromatográficas para quantificação de sulfentrazone.	57
---	----

Apêndice A

Tabela 1A. Análise de variância para as variáveis: notas de fitointoxicação (Fito) aos 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) para variedades, doses e a interação entre os dois fatores na primeira etapa do experimento A. Maringá – PR, 2018.	68
Tabela 2A. Análise de variância para a variável teor interno de chlorimuron-ethyl (chlor) para variedades de soja, momentos de coleta da planta e a interação entre os dois fatores na segunda etapa do experimento A. Maringá – PR, 2018.	68

Apêndice B

Tabela 1B. Análise de variância para as variáveis altura de planta aos 21 (AP_21DAA), e aos 30 dias após a aplicação (AP_30DAA), comprimento de raiz (CR), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) em duas variedades de soja e doses de sulfentrazone.	75
Tabela 2B. Análise de variância para a variável concentração de sulfentrazone na seiva do xilema de plantas de soja para variedades de soja, herbicida (com ou sem) e a interação entre os dois fatores. Maringá – PR, 2018.	76

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. Sintomas de fitointoxicação causadas por chlorimuron-ethyl em doses crescentes na variedade sensível, MSOY 6410 IPRO e tolerante, AS 3570 IPRO, aos 14 dias após a aplicação. Maringá-PR. 34
- Figura 2. Teor interno de chlorimuron-ethyl nas folhas de plantas de soja em função de momento da coleta após a aplicação de chlorimuron-ethyl. As barras representam os desvios padrão. 36
- Figura 3. Teores de [iso+leu] (A), valina (B) e ácido 2-aminobutírico (C) nas folhas de plantas de soja em função de variedades e momento da coleta após a aplicação de chlorimuron-ethyl. As comparações são apenas dentro de cada momento de coleta. Letras iguais nas colunas não diferem entre si, a 10% de probabilidade pelo teste t. As barras representam os desvios padrão. 37
- Figura 4. Frequência de dados de teor de diclosulam nas folhas de soja. 41
- Figura 5. Teores internos de [iso+leu] (A), valina (B) e ácido 2-aminobutírico (C) nas folhas de plantas de soja em função de variedades e momento da coleta após a aplicação de diclosulam. As comparações são apenas dentro de cada momento de coleta. Letras iguais nas colunas não diferem entre si, a 10% de probabilidade pelo teste t. As barras representam os desvios padrão. 42

Capítulo 2

- Figura 1. Altura de planta aos 21 dias após a aplicação (A), aos 30 dias após a aplicação (B), comprimento de raiz (C), massa seca de raiz (D) e massa seca de parte aérea (E) em duas variedades de soja, após a aplicação de doses crescentes de sulfentrazone. 58
- Figura 2. Concentração de sulfentrazone na seiva do xilema de plantas de soja em função de variedades de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de t, a 10% de probabilidade. As barras representam os desvios padrão. 60

Apêndice A

- Figura 1A. Cromatograma de chlorimuron-ethyl e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL⁻¹. 71

Figura 2A. Cromatograma de diclosulam e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL ⁻¹	71
Figura 3A. Cromatograma de valina e os fragmentos gerados na concentração de 37,5 ng mL ⁻¹	72
Figura 4A. Cromatograma de leucina e os fragmentos gerados na concentração de 37,5 ng mL ⁻¹	72
Figura 5A. Cromatograma de isoleucina e os fragmentos gerados na concentração de 37,5 ng mL ⁻¹	73
Figura 6A. Cromatograma de ácido 2-aminobutírico e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL ⁻¹	73
 Apêndice B	
Figura 1B. Cromatograma de sulfentrazone e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL ⁻¹	76
Figura 2B. Sintomas de fitointoxicação causadas por sulfentrazone em doses crescentes na variedade sensível, V-TOP RR e tolerante, BRS 284, aos 21 dias após a aplicação. Maringá-PR.....	77
Figura 3B. Comparação da variável sensível, V-TOP RR, intermediária, NA 5909 RG e tolerante, BRS 284 com as respectivas plantas sem aplicação aos 21 dias após a aplicação. Maringá-PR.....	77

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
REVISÃO DE LITERATURA	7
1. Inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS).....	7
1.1. Chlorimuron-ethyl	10
1.2. Diclosulam.....	11
2. Inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX)	12
2.1. Sulfentrazone	15
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 1	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Experimento A – chlorimuron-ethyl.....	27
Experimento B – diclosulam	31
Análise estatística	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Experimento A – chlorimuron-ethyl em pós-emergência	32
Experimento B – diclosulam em pré-emergência.....	40
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 2	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES.....	61

REFERÊNCIAS	62
CONCLUSÕES GERAIS	66
APÊNDICE A. Resumos de Análises de Variância e Cromatogramas dos Experimentos do Capítulo 1	67
APÊNDICE B. Resumos de Análises de Variância, Cromatogramas e Fotos dos Experimentos do Capítulo 2	74

RESUMO GERAL

SUZUKAWA, A. K., Dr. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Fevereiro de 2019. **Métodos de discriminação da sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone.** Orientador: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini; Co-orientador: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Jr.

A utilização de inibidores da ALS, como chlorimuron-ethyl e diclosulam e de herbicidas inibidores da PROTOX, como o sulfentrazone, tem voltado a ser importantes para a cultura da soja em função dos problemas de plantas daninhas resistentes ao glyphosate. Estes herbicidas apresentam seletividade para a cultura da soja e podem ser aplicados em pré-emergência. No entanto, ainda há receio na recomendação de pré-emergentes, pois pode ocorrer fitointoxicação na cultura. As variedades de soja apresentam tolerância diferencial a estes herbicidas e um “screening” convencional no campo entre variedades é trabalhoso, devido ao elevado número de variedades disponíveis no mercado e ao constante lançamento de novas variedades. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um teste para distinguir a sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone. No primeiro capítulo, foram estudados os inibidores da ALS, chlorimuron-ethyl e diclosulam. Inicialmente, identificou-se uma variedade padrão sensível e outra tolerante ao chlorimuron-ethyl, MSOY 6410 IPRO e AS 3570 IPRO, respectivamente, em doses crescentes do herbicida aplicadas em pós-emergência por meio de notas de fitointoxicação visual. Em uma segunda etapa do estudo, avaliaram-se os teores do herbicida, valina, leucina, isoleucina e ácido 2-aminobutírico na planta. Em seguida, os mesmos teores foram avaliados com a aplicação em pré-emergência de diclosulam nas variedades BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR, BMX Potência RR e BMX Energia RR. Concluímos no primeiro capítulo que a tolerância de variedades de soja ao chlorimuron-ethyl pode ser determinada por meio da quantificação de aminoácidos valina, leucina e isoleucina, quando as plantas estiverem no estágio vegetativo V4. Se a aplicação de chlorimuron-ethyl for utilizada, o método de análise do ácido 2-aminobutírico é uma ferramenta adicional e pode ser averiguada até uma semana após a aplicação do herbicida. Para a tolerância de variedades de soja ao diclosulam, ainda é necessária uma adequação de métodos, pois não se observou a mesma consistência de resultados do experimento de chlorimuron-ethyl. No segundo capítulo, a tolerância ao sulfentrazone nas variedades V-TOP RR e BRS 284 foi avaliada por meio da altura de planta, comprimento de raiz, massa seca de parte aérea e raiz. Em seguida, a concentração de sulfentrazone na seiva do xilema foi avaliada nestas variedades e na variedade NA 5909 RG. Conclui-se no segundo capítulo que a variedade V-TOP RR foi

identificada como um padrão sensível ao sulfentrazone, pela menor altura de planta, comprimento de raiz, massa seca da parte aérea e raiz em comparação à variedade BRS 284, identificado como um padrão tolerante. A metodologia de quantificação do herbicida na seiva pode atuar como teste na discriminação das variedades e, desta forma, classificou-se três níveis de sensibilidade ao sulfentrazone, sendo a V-TOP RR sensível, NA 5909 RG intermediária e BRS 284 tolerante.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Sulfonilureia. Triazolopirimidinas. Aril-triazolinonas.

GENERAL ABSTRACT

SUZUKAWA, A. K., Dr. Maringá State University (UEM), February 2019. **Methods to discriminate the sensitivity of soybean varieties to the herbicides chlorimuron-ethyl, diclosulam and sulfentrazone.** Advisor: Prof Dr. Alessandro Lucca Braccini; Co-advisor: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Jr.

The use of PROTOX inhibitor herbicides, such as sulfentrazone and ALS inhibitors, such as chlorimuron-ethyl and diclosulam have become important again due to problems of weeds resistant to glyphosate. These herbicides present selectivity to soybean crop and can be applied in pre-emergence. However, there is still concern in the recommendation of pre-emergents for phytotoxicity may occur in the crop. Soybean varieties have a differential tolerance to these herbicides and a field conventional screening among varieties is laborious due to the high number of varieties available on the market and the constant release of new varieties. The aim of the present work was to develop a test to distinguish the sensitivity of soybean varieties to the herbicides chlorimuron-ethyl, diclosulam and sulfentrazone. In the first chapter, the ALS inhibitors, chlorimuron-ethyl and diclosulam were studied. Initially, a sensitive and tolerant standard variety was identified for chlorimuron-ethyl, MSOY 6410 IPRO and AS 3570 IPRO, respectively, in increasing doses of the herbicide applied in post-emergence. In a second stage of the experiment, the contents of the herbicide, valine, leucine, isoleucine and 2-aminobutyric acid were evaluated in the plant. Then, the same contents were evaluated with the pre-emergence application of diclosulam in the varieties BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR, BMX Potência RR and BMX Energia RR. We conclude that the tolerance of soybean varieties to chlorimuron-ethyl can be determined by quantifying the amino acids valine, leucine and isoleucine when the plants are in the vegetative stage V4. If the application of chlorimuron-ethyl is used, the methodology of analysis of 2-aminobutyric acid is an additional tool and can be ascertained up to one week after application of the herbicide. For the tolerance of soybean varieties to diclosulam, a methodology adequacy is still required. In the second chapter, the tolerance to sulfentrazone in V-TOP RR and BRS 284 varieties was evaluated through plant height, root length, root and shoot dry mass. Then, the concentration of sulfentrazone was measured in the xylem sap in these varieties and in the variety NA 5909 RG. It was concluded that the V-TOP RR variety was identified as a sulfentrazone sensitive pattern by the reduction of plant height, root length, shoot and root dry mass compared to BRS 284, identified as a tolerant pattern. The methodology of herbicide quantification in the sap can act as a test in the

discrimination of the varieties, and in this way three levels of sensitivity to sulfentrazone were classified, being V-TOP RR sensitive, NA 5909 RG intermediate and BRS 284 tolerant.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill. Sulfonylurea. Triazolopyrimidine. Aryl-triazolinone.

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de herbicida é um componente vital na produção agrícola ao minimizar o uso de mão-de-obra e preservar o rendimento das culturas. A liberação da tecnologia de soja transgênica resistente ao glyphosate (RR) em 2005 foi um dos principais marcos na história da cultura, uma vez que possibilitou a utilização de um herbicida único, com amplo espectro de controle, caráter sistêmico e perfil toxicológico baixo, aplicado em pós-emergência da cultura.

Em um curto período de tempo, a utilização desta tecnologia se espalhou por todo o Brasil. Entretanto, este manejo de controle de plantas daninhas baseado na aplicação repetida de um único herbicida causou uma alta pressão de seleção e resultou no aparecimento de plantas daninhas resistentes ao glyphosate. Atualmente, elas estão entre as ameaças fitossanitárias mais problemáticas para os produtores agrícolas. Herbicidas utilizados anteriormente ao advento da soja RR ressurgem como ferramentas importantes no controle. Entre eles, destacam-se os herbicidas agrupados nos mecanismos de ação de inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), como o chlorimuron-ethyl e diclosulam e os inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), como o sulfentrazone. Estes herbicidas podem ser aplicados em pré-emergência, proporcionando efeito residual e são considerados seletivos, ou seja, são mais tóxicos para as plantas daninhas do que para a cultura da soja.

Entretanto, sabe-se que as variedades de soja apresentam tolerância diferencial a estes herbicidas. Antes do início do cultivo de soja RR, as variedades mais sensíveis e mais tolerantes eram conhecidas, mas elas não estão mais disponíveis comercialmente. Uma única empresa de melhoramento de soja lança de 10 a 20 variedades por ano, sendo impraticável a análise de todas as variedades em campo. O dispêndio de insumos, área e mão-de-obra, resulta em custos elevados e longos períodos de tempo para obter resultados, uma vez que o ciclo da cultura da soja é de aproximadamente 120 dias e dependente de clima adequado, o que não permite o cultivo o ano todo. Além disso, os produtores tendem a escolher variedades precoces e super-precoces, de ciclo curto para semear a soja o quanto antes, a fim de evitar a ferrugem asiática e para que possam iniciar a semeadura de milho e algodão safrinha o mais cedo possível após a colheita da soja. Assim sendo, a semente de soja pode estar em contato com o herbicida aplicado em pré-emergência no solo ainda ativo e disponível, além do ciclo mais curto dificultar a recuperação da planta.

Uma alternativa é desenvolver um teste que possibilite a discriminação da sensibilidade das variedades de soja a herbicidas de uma forma rápida e precisa, e que permita compreender como plantas da mesma espécie tem respostas diferentes a um herbicida. O

objetivo deste trabalho foi desenvolver um teste para distinguir a sensibilidade de variedades de soja aos herbicidas chlorimuron-ethyl, diclosulam e sulfentrazone.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS)

Os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS, também conhecida como acetohidroxiácido sintase, AHAS, E.C. 2.2.1.6) apresentam alta eficiência na atividade inibitória com baixas doses de aplicação (Duke e Dayan, 2011; Oliveira Jr., 2011, Garcia et al., 2017).

A ALS é a primeira enzima na produção dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina e a atividade da enzima ocorre nos estromas dos cloroplastos. Para a atividade da ALS é necessário a presença de três cofatores: tiamina pirofosfato (ThDP), íon magnésio (Mg^{2+}), e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). ThDP é ancorado ao sítio ativo da enzima pelo íon metálico, Mg^{2+} , já o cofator FAD não participa das principais reações e suspeita-se que pode ter uma função estrutural (Duggleby, 2005; Coruzzi et al., 2015).

As biossínteses de valina e isoleucina são sintetizadas por duas vias paralelas que utilizam o mesmo conjunto de quatro enzimas, as quais possuem dupla especificidade por substratos, enquanto que a rota para leucina parte de uma ramificação da via da valina (Figura 1). Entretanto, para ambas as rotas, primeiramente a ALS catalisa a descarboxilação de uma molécula de piruvato. Na rota da biossíntese de valina e leucina, a enzima utiliza como substrato uma segunda molécula de piruvato, o qual é um intermediário da glicólise, para formar 2-acetolactato. Na rota da biossíntese de isoleucina, o substrato utilizado pela enzima é o 2-cetobutirato, o qual é produzido pela treonina desaminase. Esta enzima é inibida por isoleucina e ativada por valina (Figura 2) (Cobb e Reade, 2010).

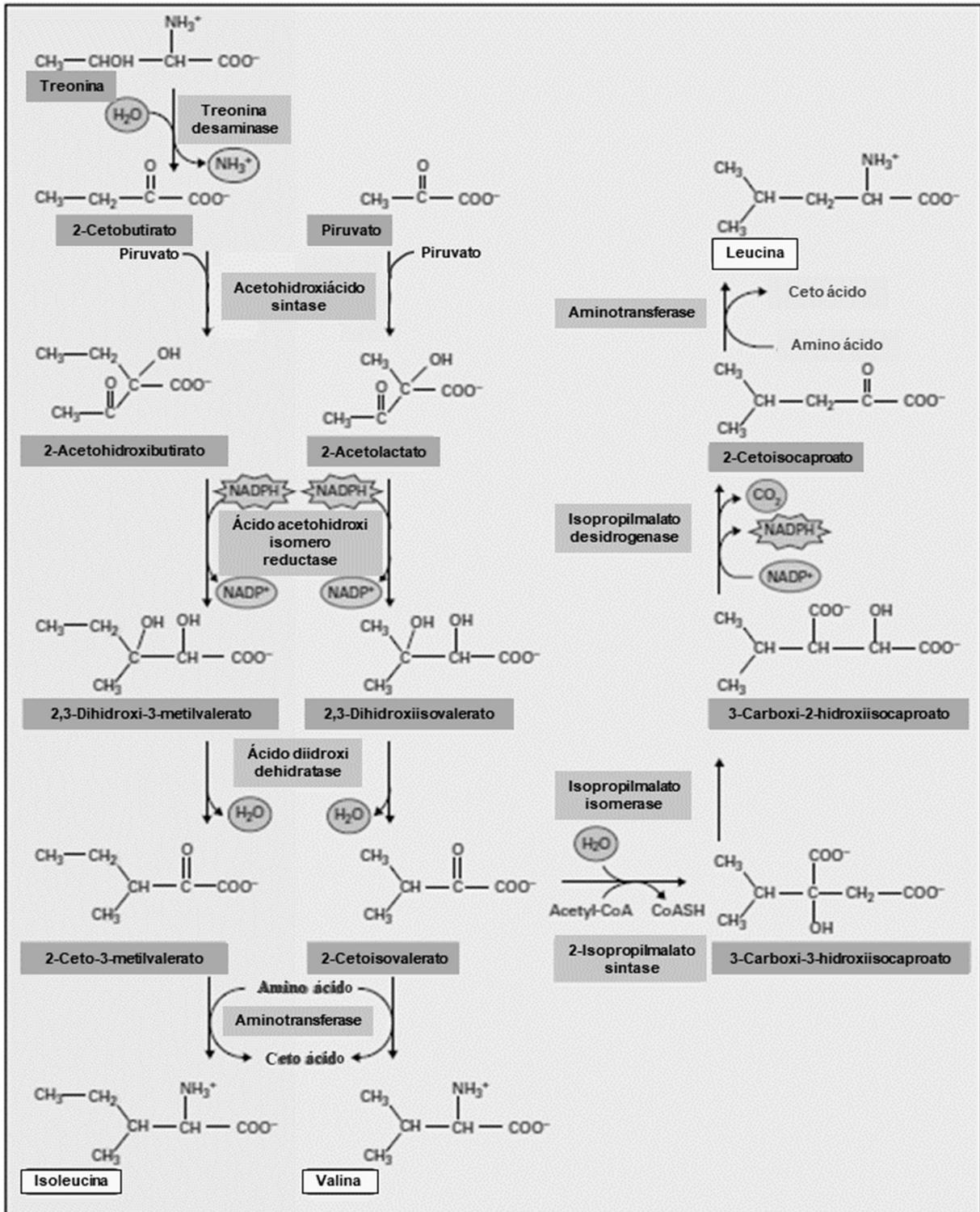


Figura 1. Biossíntese de isoleucina, leucina e valina (Coruzzi et al., 2015, com modificações).

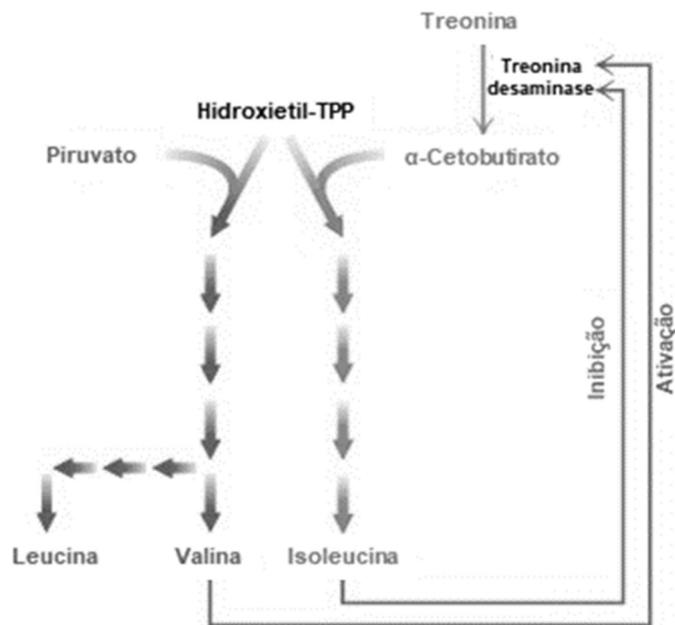


Figura 2. Regulação da enzima treonina deaminase por valina e isoleucina (Berg et al., 2002, com modificações).

Com a atuação dos herbicidas inibidores da ALS, há redução ou bloqueio na atividade da enzima, resultando em deficiência dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina. Plantas tratadas com estes herbicidas cessam o crescimento, eventualmente murcham e, devido ao acúmulo de antocianina causada pelo estresse, as nervuras das folhas ficam avermelhadas (Duke e Dayan, 2011).

Cinco grupos químicos de herbicidas, sulfonilureias, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil-benzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas compartilham deste mecanismo de ação (Duke e Dayan, 2011; Oliveira Jr., 2011, Garcia et al., 2017). A inibição da ALS por herbicidas tem um complexo mecanismo que não segue um mesmo padrão para todos os grupos químicos e dos mais de 50 inibidores de ALS aprovados para uso comercial como herbicidas, nenhum deles se assemelha aos substratos ou aos produtos da reação. De modo geral, inibidores da ALS não seguem os tipos clássicos de inibição enzimática (Garcia et al., 2017). Imidazolinonas (Shaner et al., 1984) e o chlorsulfuron, das sulfonilureias são inibidores não-competitivos em relação ao piruvato (Durner et al., 1991, Saari et al., 1994). Triazolopirimidinas apresentam inibição do tipo mista em relação ao piruvato (Subramanian e Gerwick, 1989; Saari et al., 1994). Em contrapartida, o herbicida bispyribac do grupo pirimidinil-benzoatos e os herbicidas propoxycarbazone e thienecarbazone methyl do grupo sulfonilamino-carbonil-triazolinonas bloqueiam o acesso do substrato ao canal do sítio ativo da enzima, além de causar degradação da ThDP (Garcia et al., 2017).

Com a inibição da ALS, além da inibição da biossíntese dos aminoácidos, há o acúmulo de um dos precursores, 2-oxobutirato, o qual é transaminado (o grupo α -amino é transferido para um α -cetoácido) para o ácido 2-aminobutírico (Figura 3) (Rhodes et al., 1987; Duke e Dayan, 2011). Porém, a fitointoxicação não ocorre devido à acumulação destes compostos, mas devido à deficiência destes aminoácidos (Shaner e Singh, 1993) e a inibição do crescimento da planta pelo herbicida parece ser superada pela adição destes aminoácidos no meio de cultura (Cobb e Reade, 2010; Salamez et al., 2015).

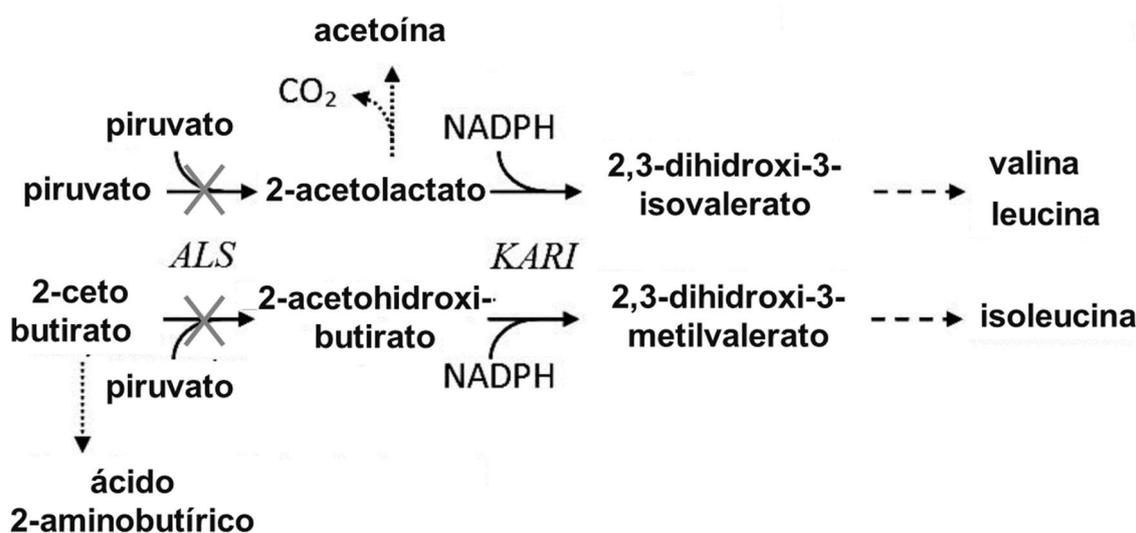


Figura 3. Acúmulo de ácido 2-aminobutírico em resposta à inibição da ALS (Dayan et al., 2015, com modificações).

1.1. Chlorimuron-ethyl

O chlorimuron-ethyl (ethyl 2-4-chloro-6-methoxypyrimidin- 2-ylcarbamoylsulfamoyl benzoate) é um importante herbicida inibidor da ALS, sendo do grupo das sulfonilureias. É formulado como um granulado dispersível. Apresenta solubilidade em água de 450 mg L⁻¹ (pH 6,5), pressão de vapor 5 x 10⁻¹⁰ Pa (25 °C), constante de dissociação (pKa) 4,2 e coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}_{pH5}) 320 (K_{ow}_{pH7}) 2,3 (Rodrigues e Almeida, 2018).

A recomendação no controle de plantas daninhas é em pós-emergência da soja, entretanto, apresenta um bom nível de controle de algumas dicotiledôneas em pré-emergência. A faixa de doses recomendada encontra-se entre 10 e 20 g ha⁻¹, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta daninha, com eficiente controle de carrapicho-rasteiro (*Acanthospermum australe*), carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum*), mentrasto

(*Ageratum conyzoides*), caruru (*Amaranthus hybridus* e *Amaranthus viridis*), picão-preto (*Bidens* spp.), erva-palha (*Blainvillea latifolia*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), buva (*Conyza* spp.), desmódio (*Desmodium tortuosum*), falsa-serralha (*Emilia sonchifolia*), leiteira ou amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), picão-branco (*Galinsoga parviflora*), fazendeiro (*Hyptis lophanta*), cheirosa (*Hyptis suaveolens*), corda-de-viola (*Ipomea aristolochiaefolia*, *I. grandifolia*, *I. purpurea*), estrelinha (*Melampodium perfoliatum*), losna-branca (*Parthenium hysterophorus*), beldroega (*Portulaca oleracea*), nabiça (*Raphanus raphanistrum*), nabo (*Raphanus sativus*), maria-mole (*Senecio brasiliensis*), fedegoso-branco (*Senna obtusifolia*), erva-quente (*Spermacoce latifolia*), erva-de-touro (*Tridax procumbens*) e feijão-miúdo (*Vigna unguiculata*) (Rodrigues e Almeida, 2018). Apesar do relato da resistência de buva com resistência múltipla ao chlorimuron-ethyl e glyphosate (Santos et al., 2014), este herbicida ainda é uma das melhores ferramentas no controle da espécie, com excelente controle em misturas com o glyphosate até o estágio de desenvolvimento de nove folhas (Bressanin et al., 2014).

Apresenta adsorção e lixiviação moderadas e sua meia-vida no solo pode ser de aproximadamente 7 a 70 dias dependendo do solo (Wang et al., 2018). Aplicações de chlorimuron-ethyl na cultura da soja não alteraram o desenvolvimento das culturas de batata, tomate, milho (Soltani et al., 2005) e não afetaram o rendimento do milho em semeaduras realizadas a partir de 80 dias após a aplicação (Dan et al., 2011).

Apesar da seletividade do chlorimuron-ethyl, há relatos de fitointoxicação com redução na altura de plantas, rendimento, clorose intensa e arroxamento na nervura central das folhas nas variedades de soja Asgrow 5403, Asgrow 5979, Asgrow 6297, Asgrow 6785, Coker 686, Coker 6995 and Deltapine 566, Hartz 6686, Hutcheson, Sharkey, Terra-Vig 515 e 9641 Pioneer (Newsom e Shaw, 1992; Artuzi e Contiero, 2006).

1.2. Diclosulam

O diclosulam [N-(2,6-diclorofenil)-5-etoxi-7-fluor-(1,2,4)triazolo(1,5-c)pirimidina-2-sulfonamida] também é um inibidor da ALS, do grupo químico das triazolopirimidinas. Apresenta solubilidade de 117 mg L⁻¹ (pH 5), 124 mg L⁻¹ (pH 7), 4290 mg L⁻¹ (pH 9), pressão de vapor 6,58 x 10⁻⁸ Pa (25 °C), constante de dissociação (pKa) 4,09 e coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}_{pH5}) 1,42, (K_{ow}_{pH7}) -0,047 e (K_{ow}_{pH9}) -0,448. O seu uso está registrado para as culturas da soja e de cana-de-açúcar, sob o nome comercial de Spider 840 WG e Coact, respectivamente. Para a cultura da soja, a recomendação de dose está na faixa de 20-35 g ha⁻¹ e

para a cana-de-açúcar, 105,8-194 g ha⁻¹, ambos na modalidade de aplicação de pré-emergência (Rodrigues e Almeida, 2018). A utilização da dose de 35 g ha⁻¹ deve ser utilizada com cautela, como se observa em trabalho de Biffe (2012), pode ocorrer redução na produtividade na cultura da soja, especialmente quando a soja é cultivada em solos compactados.

Há registro de diclosulam para o controle de: carrapicho-rasteiro (*Acanthospermum australe*), carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), caruru (*Amaranthus viridis*), picão-preto (*Bidens pilosa*), capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*), buva (*Conyza* spp.), gervão-branco (*Croton glandulosus*), tiririca (*Cyperus rotundus*), carrapicho-beiço-de-touro (*Desmodium tortuosum*), capim-colchão (*Digitaria horizontalis*), capim-amargoso (*Digitaria insularis*), falsa-serralha (*Emilia sonchifolia*), botão-azul (*Eupatorium pauciflorum*), leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), erva-de-santa-luzia (*Euphorbia hirta*), cheirosa (*Hyptis suaveolens*), corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*), sensitiva (*Mimosa invisa*), beldroega (*Portulaca oleracea*), nabo (*Raphanus raphanistrum*), guanxuma (*Sida rhombifolia*), erva-quente (*Spermacoce latifolia*), erva-de-touro (*Tridax procumbens*) e carrapichão (*Xanthium strumarium*) (Rodrigues e Almeida, 2018). O relato da resistência de buva com resistência múltipla ao chlorimuron-ethyl e glyphosate (Santos et al., 2014) demonstra que o diclosulam, por ser de um grupo químico diferente, é uma importante opção de controle desta espécie (Oliveira Neto et al., 2013).

A adsorção no solo pelo diclosulam é influenciada principalmente pelos teores de umidade e matéria orgânica (Kd = 0,6 a 3,8 L kg⁻¹) (Rodrigues e Almeida, 2018). Apresenta elevada mobilidade na palha, sendo indicado para utilização no sistema de plantio direto (Cobucci et al., 2004). Apresenta meia-vida (t_{1/2}) de 22 a 43 dias e não se recomenda rotação com as culturas do girassol, sorgo e brássicas após a colheita da soja (Rodrigues e Almeida, 2018).

Na cultura da soja, na fase inicial de desenvolvimento da planta, os relatos de intoxicação são observados com manchas cloróticas nas folhas. Nos estádios de desenvolvimento seguintes, podem ser observadas reduções na altura das plantas e diminuições na produtividade (Roman et al., 2000; Osipe et al., 2014; Fornazza et al., 2018). O encarquilhamento também é uma característica da injúria provocada por diclosulam (Biffe, 2012).

2. Inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX)

O primeiro precursor na biossíntese de clorofila e heme é o ácido 5-aminolevulínico, o qual é produzido a partir do glutamato e ocorre no interior do cloroplasto. Em uma das etapas seguintes, a enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX, E.C. 1.3.3.4) age na conversão do protoporfirinogênio-IX em protoporfirina-IX (Figura 4a). A protoporfirina-IX pode ser convertida em heme pela ferroquelatase, a qual insere um átomo de ferro no anel tetrapirrólico, ou em clorofila, através da adição de um átomo de Mg^{+2} pela magnésio quelatase (Figura 5) (Niyogi et al., 2015).

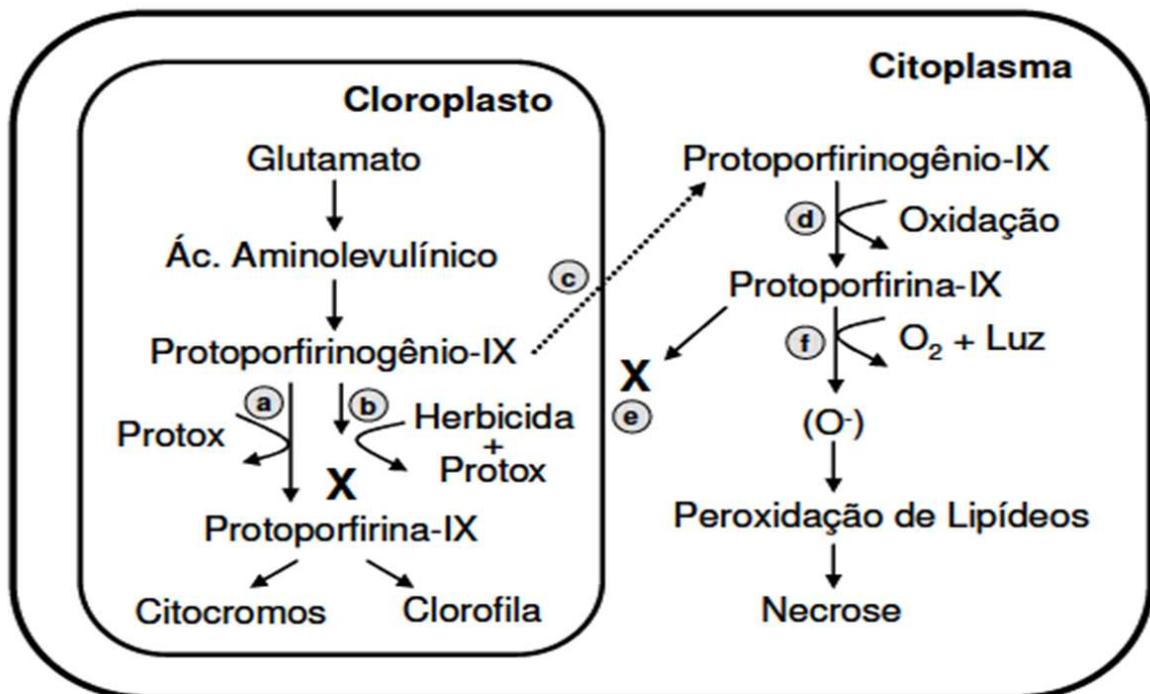


Figura 4. Esquema do mecanismo de ação dos herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (Protox). a: Reação de conversão do protoporfirinogênio-IX em protoporfirina-IX; b. Presença do herbicida e inibição competitiva da PROTOX; c. Difusão do protoporfirinogênio-IX acumulado para fora do citoplasma; d. Oxidação do protoporfirinogênio-IX a protoporfirina-IX; e. Protoporfirina-IX não pode retornar ao citoplasma; f. Formação de oxigênio 'singlet', peroxidação dos lipídeos e necrose da célula (Carvalho e López-Ovejero, 2008).

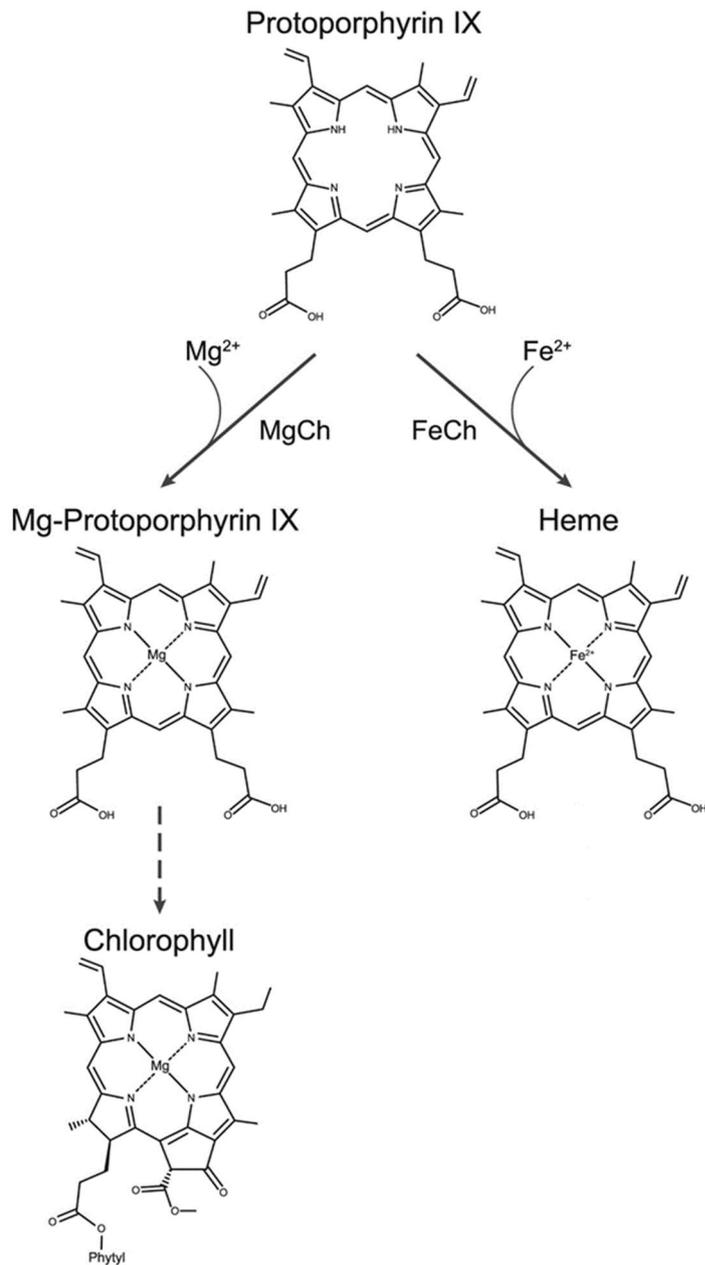


Figura 5. A protoporfirina-IX pode ser convertida em heme pela ferroquelatase, pela inserção de um átomo de ferro no anel ou convertida em clorofila pela magnésio quelatase, pela inserção de um átomo de magnésio no anel (Busch e Montgomery, 2015, com modificações).

Com os herbicidas inibidores da Protox, ocorre a inibição competitiva da enzima, resultando em acúmulo de protoporfirinogênio-IX dentro do cloroplasto (Figura 4b). Com a alta concentração de protoporfirinogênio-IX no cloroplasto, este difunde-se para o citoplasma (Figura 4c), sendo rapidamente oxidado para protoporfirina-IX por peroxidases (Figura 4d). A protoporfirina IX não pode retornar ao citoplasma (Figura 4e), portanto, a rota da síntese de heme e clorofila é interrompida. Devido à natureza fotodinâmica da porfirina, na presença de

luz e oxigênio molecular produz oxigênio singlet altamente reativo, que induz à peroxidação de lipídeos e, por consequência, destruição de membranas celulares (Figura 4f) (Carvalho e López-Ovejero, 2008; Dayan e Duke, 2010).

Os herbicidas inibidores da PROTOX são classificados em cinco grupos químicos: difeniléteres, N-fenilftalimidias, oxadiazóis, pirimidinadionas e aril-triazolinonas. A maioria dos herbicidas desta classe são aplicados em pós-emergência, entretanto, alguns são aplicados em pré-emergência, como o sulfentrazone (Duke e Dayan, 2011, Oliveira Jr., 2011). Nas plantas, existem duas isoformas da enzima Protox, a Protox do cloroplasto e a Protox da mitocôndria. Apesar de se acreditar que os herbicidas somente inibiam a enzima dos cloroplastos, há relatos de acúmulo de protoporfirina IX em mitocôndrias vegetais e modificações na enzima das mitocôndrias de plantas daninhas resistentes, o que demonstra que a Protox mitocondrial da planta também é um alvo molecular desses herbicidas (Dayan et al., 2018).

2.1. Sulfentrazone

O sulfentrazone (2',4'-dichloro-5-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl) é um herbicida do grupo químico das aril-triazolinonas, registrado para as culturas da soja, cana-de-açúcar, café, citrus, abacaxi e fumo. Apresenta solubilidade de 110 mg L⁻¹ (pH 6), pressão de vapor 1 x 10⁻⁷ Pa (25 °C), constante de dissociação (pKa) 6,56 e coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}_{pH7}) 9,8. A faixa de doses recomendadas varia desde 100 a 700 g ha⁻¹, dependendo do tipo de solo, cultura e planta daninha a ser controlado. Para a cultura da soja, há recomendação de aplicação de 600 g ha⁻¹, porém, para solos leves ou médios, recomenda-se, dependendo do alvo, a aplicação de 400 g ha⁻¹ (Rodrigues e Almeida, 2018). Entretanto, em trabalho de Biffe (2012), ao utilizar a dose de 600 g ha⁻¹, na variedade V-MAX RR, foram observadas injúrias de necrose e encarquilhamento, assim como perdas de até, aproximadamente 700 kg ha⁻¹ em comparação à testemunha. Ao utilizar 300 g ha⁻¹, Osipe et al. (2014) constataram que não houve quedas na produtividade da mesma variedade de soja, apesar de injúrias terem sido observadas. Portanto, a utilização da dose recomendada de bula de sulfentrazone pode resultar em drásticos danos à cultura. A absorção é radicular, com translocação limitado pelo floema (Rodrigues e Almeida, 2018).

Este herbicida é recomendado para aplicação em pré-emergência, com controle de várias espécies: carrapicho-rasteiro (*Acanthospermum australe*), carrapicho-de-carneiro (*A. hispidum*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), caruru-roxo (*Amaranthus hybridus*), caruru (*A.*

retroflexus), caruru-de-mancha ou caruru (*A. viridis*), picão-preto (*Bidens* spp.), erva-palha (*Blainvillea latifolia*), capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*), capim-marmelada (*B. plantaginea*), capim-carrapicho (*Cenchrus echinatus*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), buva (*Conyza* spp.), grama-seda (*Cynodon dactylon*), tiririca (*Cyperus rotundus*), desmódio (*Desmodium tortuosum*), capim-colchão (*Digitaria horizontalis*), capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*), falsa-serralha (*Emilia sonchifolia*), amendoim-bravo ou leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), cheirosa (*Hyptis suaveolens*), corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*), joá-de-capote (*Nicandra physaloides*), capim-colonião (*Panicum maximum*), losna-branca (*Parthenium hysterophorus*), capim-custódio (*Pennisetum setosum*), beldroega (*Portulaca oleracea*), capim-favorito (*Rhynchelitrum roseum*), poaia-branca (*Richardia brasiliensis*), guanxuma (*Sida glaziovii* e *S. rhombifolia*), maria-pretinha (*Solanum americanum*) e erva-quente (*Spermacoce alata* e *S. latifolia*) (Rodrigues e Almeida, 2018). Sulfentrazone apresenta também um controle notório sobre tiririca (Holm et al., 1977).

Em relação ao comportamento no solo, apresenta moderada mobilidade e baixa adsorção ($K_{oc} = 43 \text{ mL g}^{-1}$) (Rodrigues e Almeida, 2018). A persistência no solo pode prejudicar a cultura subsequente, pois a sua meia-vida no solo ($t_{1/2}$) é estimada entre 110 e 280 dias (Cavaliere et al., 2017), podendo alcançar 376 dias após a aplicação (Blanco e Velini, 2005). O efeito residual da dose de 314,4 e 600 g ha⁻¹ de sulfentrazone aplicado na cultura da soja reduziu a produtividade do algodoeiro em 10 e 30%, respectivamente (Cavaliere et al., 2017). O resíduo de sulfentrazone afeta também o crescimento e rendimento das culturas de milho e aveia, assim como do trigo, na dose de 1200 g ha⁻¹ (Blanco e Velini, 2005).

O sulfentrazone pode causar danos à cultura da soja, incluindo sintomas de entrenós mais curtos, redução do crescimento das raízes, clorose foliar, redução de área foliar, de formação de nódulos, de massa seca dos nódulos e do acúmulo de N₂ na parte aérea e, em casos graves, morte de plantas (Dayan et al., 1997; Taylor-Lovell et al., 2001; Zobiolo et al., 2007). Um dos sintomas mais característicos é a necrose do colo da planta, onde o caule toca o solo.

REFERÊNCIAS

- ARTUZI, J. P.; CONTIERO, R. L. Herbicidas aplicados na soja e produtividade do milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1119-1123, 2006.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. The Biosynthesis of Amino Acids. In: _____. **Biochemistry**. 5 ed. New York: W H Freeman; 2002. cap. 24, p. 665-692.
- BIFFE, D. F. **Efeito da aplicação de herbicidas em pré-emergência e de glyphosate em pós-emergência, sobre a cultura da soja em solo compactado e não compactado**. 2012. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- BLANCO, F. M. G.; VELINI, E. D. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com soja e seu efeito em culturas sucedâneas. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 693-700, 2005.
- BRESSANIN, F. N.; JAYME NETO, N.; MARTINS, J. F.; MARTINS, J. V. F.; ALVES, P. L. C. A. Controle de biótipos resistentes de *Conyza bonariensis* com glyphosate + clorimuron-etílico em função do estágio de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 68-72, 2014.
- BUSCH, A. W. U.; MONTGOMERY, B. L. Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response. **Redox Biology**, v. 4, p. 260-271, 2015.
- CARVALHO, S. J. P.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da PROTOX (Grupo E). In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.67-76.
- CAVALIERI, S. D.; MATTE, W. D.; PEREIRA C. S.; IKEDA, F. S.; ANDRADE Jr, E. R.; SHENG, L. Y.; COSTA, W. B.; POLTRONIERI, F.; SARAIVA, M. V. Carryover de sulfentrazone na sucessão soja-algodão. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 11., 2017, Maceió. **Anais...** Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão - Abrapa, 2017.
- COBB, A. H.; READE, J. P. H. The Inhibition of Amino Acid Biosynthesis. In: _____. **Herbicides and Plant Physiology**. 2 ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 176-199.

COBUCCI, T.; PORTELA, C. M. O.; SILVA, W.; NETO MONTEIRO, A. Efeito residual de herbicidas em pré-plantio do feijoeiro, em dois sistemas de aplicação em plantio direto e sua viabilidade econômica. **Planta Daninha**, v.22, n.4, p.583-590, 2004.

CORUZZI, G.; LAST, R.; DUDAREVA, N.; AMRHEIN, N. Amino Acids. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2 ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 289-336.

DAN, H. A.; BARROSO, A. L. L.; DAN, L. G. M.; PROCÓPIO, S. O.; OLIVEIRA JR., R. S.; SIMON, G. A.; MUNHOZ, D. M. Atividade residual de herbicidas aplicados em pós-emergência na cultura da soja sobre o milho cultivado em sucessão. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 663-671, 2011.

DAYAN, F. E.; BARKER, A.; TRANEL, P. J. Origins and structure of chloroplastic and mitochondrial plant protoporphyrinogen oxidases: implications for the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, v. 74, n. 10, p. 2226-2234, 2018.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Protoporphyrinogen oxidase – inhibiting herbicides. In: KRIEGER, R.; DOULL, J.; HODGSON, E.; MAIBACH, H.; REITER, L.; RITTER, L.; ROSS, J.; SLIKKER, W. J.; VAN HEMMEN, J. (eds.) **Haye's Handbook of Pesticide Toxicology**. 3 ed. Vol. 2. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2010. p. 1733-1751.

DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; CORNIANI, N.; SILVA, F. M. L.; WATSON, S. B.; HOWELL, J. L.; SHANER, D. L. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. **Weed Science**, v. 63, p. 23–63, 2015.

DAYAN, F. E.; WEETE, J. D.; DUKE, S. O.; HANCOCK, H. G. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. **Weed Science**, v. 45, n. 5, p. 634-641, 1997.

DUGGLEBY, R. G. Suicide inhibition of acetohydroxyacid synthase by hydroxypyruvate, **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 1-4, 2005.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Bioactivity of herbicides. In: MOO-YOUNG, M. (ed.) **Comprehensive Biotechnology**. 2 ed. v. 4. Amsterdam: Elsevier Press, 2011. p. 23-35.

DURNER, J.; GAILUS, V.; BÖGER, P. New aspects of inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. **Plant Physiology**, v. 95, p. 1144-1149, 1991.

FORNAZZA, F. G. F.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, F. G.; OLIVEIRA Jr., R. S.; SILVA, G. D.; RIOS, F. A. Selectivity of pre-and post-emergence herbicides to very-early maturing soybean cultivars. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 4, p. 649-658, 2018.

GARCIA, M. D.; NOUWENS, A.; LONHIENNE, T. G.; GUDDAT, L. W. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 7, p. E1091-E1100, 2017.

HOLM, G. L.; PLUCKNETT, D. L.; PANCHO, J. V.; HERBERGER, J. P. **World's worst weeds – distribution and biology**. Honolulu: University Press of Hawaii, 1977. 610 p.

NEWSOM, L. J.; SHAW, D. R. Soybean (*Glycine max*) response to chlorimuron and imazaquin as influenced by soil moisture. **Weed Technology**, v. 6, n. 2, p. 389-395, 1992.

NIYOGI, K. K.; WOLOSUK, R. A.; MALKIN, R. Photosynthesis. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2 ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 508-566.

OLIVEIRA Jr., R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA Jr., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (eds.) **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 141-191.

OLIVEIRA NETO, A. M.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA Jr., R. S.; GUERRA, N.; BRAZ, G. B. P.; VILELA, L. M. S.; BOTELHO, L. V. P.; ÁVILA, L. A. Sistemas de dessecação em áreas de trigo no inverno e atividade residual de herbicidas na soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.1, p.14-22, 2013.

OSIPE, J. B.; OLIVEIRA Jr., R. S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D. F.; RIOS, F. A.; FRANCHINI, L. H. M.; GHENO, E. A.; RAIMONDI, M. A. Seletividade de aplicações

combinadas de herbicidas em pré e pós-emergência para a soja tolerante ao glyphosate. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 623-631, 2014.

RHODES, D.; HOGAN, A.; DEAL, L.; JAMIESON, G.; HOWARTH, P. Amino acid metabolism of *Lemna minor* L. responses to chlorsulfuron. **Plant Physiology**, v. 84, p. 775-780, 1987.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 7 ed. Londrina: Edição dos autores, 2018. 764 p.

ROMAN, E. S.; TOSSO, F.; MARINHO, J. A. A. Respostas de cultivares de soja a herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 2, p. 133-138, 2000.

SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; THILL, D. C. Resistance to acetolactase synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. (eds) **Herbicide resistance in plants. Biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 83-140.

SUBRAMANIAN, M. V.; GERWICK, B. C. Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines: a review of recent developments. In: WHITAKER, J. R.; SONNET, B. E. (eds) **Biocatalysis in Agricultural Biotechnology**. ACS Symposium Series No. 389. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 277-288.

SALAMANEZ, K. C.; BALTAZAR, A. M.; RODRIGUEZ, E. B.; LACSAMANA, M. S.; ISMAIL, A. M.; JOHNSON, D. E. Addition of branched-chain amino acids can reverse propyrisulfuron-induced acetolactate synthase (ALS) and growth inhibition in three rice cultivars and five weed species. **The Philippine Agricultural Scientist**, v. 98, n. 4, p. 351-361, 2015.

SANTOS, G.; OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, A. C.; OSIPE, J. B. Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl and to glyphosate. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 409-416, 2014.

SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, v. 76, p. 545-546, 1984.

SHANER, D. L.; SINGH, B. K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1221-1226, 1993.

SOLTANI, N.; SIKKEMA, P. H.; ROBINSON, D. E. Vegetable crop responses to chlorimuron-ethyl applied in the previous year. **Crop Protection**, v. 24, n. 7, p. 685-688, 2005.

SUBRAMANIAN, M. V.; GERWICK, B. C. Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines: a review of recent developments. In: WHITAKER, J. R.; SONNET, B. E. (eds) **Biocatalysis in Agricultural Biotechnology**. ACS Symposium Series No. 389. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 277-288.

TAYLOR-LOVELL, S.; WAX, L. M.; NELSON, R. Phytotoxic response and yield of soybean (*Glycine max*) varieties treated with sulfentrazone or flumioxazin. **Weed Technology**, v. 15, n. 1, p. 95-102, 2001.

WANG, J.; LI, X.; LI, X.; WANG, H.; SU, Z.; WANG, X.; ZHANG, H. Dynamic changes in microbial communities during the bioremediation of herbicide (chlorimuron-ethyl and atrazine) contaminated soils by combined degrading bacteria. **PLoS ONE**, v. 13, n.4, p. e0194753, 2018

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA Jr., R. S.; TORMENA, C.; CONSTANTIN, J.; CAVALIERI, S. D.; ALONSO, D. G.; BRIGUENTI, A. M.; CASTRO, C. Efeito da compactação do solo e do sulfentrazone sobre a cultura da soja em duas condições de água no solo. **Planta Daninha**, v. 25, p. 537-545, 2007.

CAPÍTULO 1

Método para diferenciação de variedades de soja sensíveis e tolerantes ao
chlorimuron-ethyl e diclosulam

Método para diferenciação de variedades de soja sensíveis e tolerantes ao chlorimuron-ethyl e diclosulam

RESUMO

Herbicidas inibidores da ALS como o chlorimuron-ethyl e o diclosulam são ferramentas importantes para o controle de plantas daninhas resistentes ao glyphosate. Entretanto, na cultura da soja, as variedades apresentam sensibilidade diferencial a estes herbicidas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi determinar um método que permita distinguir a susceptibilidade de variedades de soja a chlorimuron-ethyl e diclosulam. O estudo foi dividido em experimentos A e B, para chlorimuron-ethyl e diclosulam, respectivamente. No experimento A, duas variedades de soja, MSOY 6410 IPRO e AS 3570 IPRO, foram avaliadas em relação aos níveis de fitotoxicidade ao chlorimuron-ethyl aplicados em pós-emergência em três doses, além de uma testemunha não tratada. Em seguida, foi verificado se a absorção do chlorimuron-ethyl nas folhas, os teores de aminoácidos valina, leucina e isoleucina e o ácido 2-aminobutírico diferiam entre as variedades. No experimento B, realizou-se a mesma quantificação em quatro variedades de soja, BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR, BMX Potência RR e BMX Energia RR, com aplicação do diclosulam em pré-emergência. No experimento A, concluiu-se que a intensidade de absorção do chlorimuron-ethyl não difere entre as variedades de soja. O teor dos aminoácidos de cadeia ramificada na variedade tolerante foi superior ao encontrado na variedade sensível, mesmo sem a aplicação do chlorimuron-ethyl. Após a aplicação do herbicida, os teores de aminoácidos de cadeia ramificada na variedade tolerante não foram alterados. O teor destes aminoácidos apresentou-se como potencial identificador da susceptibilidade diferencial de variedades de soja para o chlorimuron-ethyl. Para o ácido 2-aminobutírico, foram encontrados valores superiores na variedade sensível aplicada em relação à respectiva testemunha e à variedade tolerante. Para o experimento B, entretanto, não foram obtidas as respostas consistentes. Apesar da ausência do teor de diclosulam na planta nos estádios unifoliolado e 1º trifólio, observou-se aumento nos teores do ácido 2-aminobutírico na planta, o que indica a ação do herbicida.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Inibidor da ALS. Sulfonilureia. Triazolopirimidinas. Seletividade.

Method to differentiate sensitive and tolerant soybean varieties to chlorimuron-ethyl and diclosulam

ABSTRACT

ALS inhibitor herbicides, such as chlorimuron-ethyl and diclosulam are important tools for controlling weeds resistant to glyphosate. However, in soybean crop, the varieties present a differential sensitivity to these herbicides. Thus, the aim of this work was to determine a method to distinguish the susceptibility of soybean varieties to chlorimuron-ethyl and diclosulam. The study was divided into experiments A and B, for chlorimuron-ethyl and diclosulam, respectively. In the experiment A two soybean varieties, MSOY 6410 IPRO and AS 3570 IPRO, were evaluated for phytotoxicity levels to chlorimuron-ethyl applied in post-emergence, in three different rates, with an untreated check. Then, it was verified if the absorption of chlorimuron-ethyl by the leaves, the amino acids valine, leucine and isoleucine and 2-aminobutyric acid contents differed among the varieties. In experiment B, the same quantification was made in four soybean varieties, BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR, BMX Potência RR and BMX Energia RR, with application of diclosulam in pre-emergence. In experiment A, it was concluded that the absorption intensity of chlorimuron-ethyl did not differ between soybean varieties. The branched-chain amino acids content in the tolerant variety was naturally higher than that found in the sensitive variety, even without the application of chlorimuron-ethyl. With application of the herbicide, the branched chain amino acid contents in the tolerant variety were not altered. These amino acids content presented as a potential identifier of the differential susceptibility of soybean varieties to chlorimuron-ethyl. For 2-aminobutyric acid, higher values were found in the sensitive variety applied in relation to the respective control and the tolerant variety. For experiment B, however, the same consistent responses were not obtained. In spite of the absence of the diclosulam content in the plant in the unifoliolate and first three-leaf stages, there was an increase in the levels of 2-aminobutyric acid in the plant, indicating the herbicide acted in the plant.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill. ALS inhibitor. Sulfonylurea. Triazolopyrimidine. Selectivity.

INTRODUÇÃO

Herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS, também conhecida como acetohidroxiácido sintase) são ferramentas importantes para o controle de plantas daninhas resistentes ao glyphosate na cultura da soja. Atuam em pequenas doses, com um controle efetivo e seletivo. Cinco grupos químicos fazem parte dos inibidores da ALS: sulfonilureias, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil-benzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (Duke e Dayan, 2011; Oliveira Jr., 2011; Garcia et al., 2017).

A enzima ALS atua em uma das primeiras etapas na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina. A atividade da ALS depende da presença de três cofatores, tiamina pirofosfato (ThDP), íon magnésio (Mg^{2+}) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A inibição da enzima em *Arabidopsis thaliana* por chlorimuron-ethyl sugere que a inibição é acumulativa e reversível, enquanto para imazaquim apresentou-se irreversível. A inibição acumulativa caracteriza-se pela capacidade do inibidor de se ligar à enzima, inativá-la, em seguida, desprender-se e estar disponível para inativar outras moléculas desta enzima. Além disso, FAD é oxidado e o ThDP é alterado quimicamente, o que impossibilita a ativação da enzima (Garcia et al., 2017; Lonhienne et al., 2018).

Quando a enzima é inibida, além da biossíntese dos aminoácidos diminuir, um dos precursores, 2-cetobutirato acumula e ocorre a consequente transaminação (o grupo α -amino é transferido para um cetoácido) do precursor para ácido 2-aminobutírico (Rhodes et al., 1987; Duke e Dayan, 2011). Porém, os sintomas de fitointoxicação observados nas plantas não ocorrem pelo acúmulo destes compostos, mas sim pela deficiência dos aminoácidos (Shaner e Singh, 1993). Estudos demonstram que a fitointoxicação também ocorre devido ao acúmulo de carboidratos solúveis nas folhas e a inibição do transporte pelo floema, consequentemente a força dos drenos da planta diminui (Zabalza et al., 2013; Zhao et al., 2016).

Quando os herbicidas inibidores da ALS são aplicados em pré-emergência, a absorção pela semente ocorre por difusão (Rieder et al., 1970). As sementes de plantas daninhas ainda germinam, provavelmente utilizando as reservas das sementes, porém o desenvolvimento da planta não evolui além do estágio de cotilédones em dicotiledôneas e do estágio de duas folhas em monocotiledôneas. A inibição do crescimento de raízes ocorre em poucas horas após o contato com o herbicida (Cobb e Reade, 2010), o que pode também ser a forma como os herbicidas controlam estas plantas. Em raízes de ervilha, o chlorsulfuron foi responsável pelo bloqueio da fase G2 da interfase para a mitose e pela desaceleração da fase G1 para a síntese de DNA, no ciclo celular (Rost, 1984). A redução na concentração de espermidina nas pontas

das raízes de milho, pode ser responsável por este efeito na divisão celular (Giardina e Carosi, 1990).

Loper et al. (2002) desenvolveram uma técnica para detectar inibidores da ALS utilizando o ácido 2-aminobutírico como marcador bioquímico. Este composto pode ser utilizado como marcador inclusive em sub-doses tão baixas quanto 20% da dose recomendada (Loper et al., 2002) ou em solos com inibidores da ALS (Li e Wang, 2005). Loper et al. (2002) sugerem que a utilização da análise do ácido 2-aminobutírico pode ser um método para determinar o nível de seletividade a herbicidas inibidores da ALS.

O chlorimuron-ethyl (ethyl 2-4-chloro-6-methoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl benzoate) pertence ao grupo das sulfonilureias. A recomendação no controle de plantas daninhas é em pós-emergência da soja, entretanto apresenta um bom nível de controle também em pré-emergência (Rodrigues e Almeida, 2018). Este herbicida se destaca pelo excelente controle de buva (*Conyza sumatrensis*) em mistura com glyphosate (Bressanin et al., 2014). Apesar do relato da resistência múltipla desta planta daninha aos dois herbicidas (Santos et al., 2014), ainda é uma das melhores opções no controle da espécie.

O diclosulam [N-(2,6-diclorofenil)-5-etoxi-7-fluor-(1,2,4)triazolo(1,5-c)pirimidina-2-sulfonamida] pertence ao grupo das triazolopirimidinas. Apresenta seletividade para as culturas da soja e cana-de-açúcar, nas doses entre 20-35 g ha⁻¹ e, 105,8-194 g ha⁻¹, respectivamente, ambas na modalidade de aplicação de pré-emergência (Rodrigues e Almeida, 2018). A importância do uso de diclosulam destaca-se por ainda não haver registro de planta daninha resistente a este herbicida no Brasil, com exceção do relato da espécie *Euphorbia heterophylla* em 2004 (Heap, 2019).

Apesar de chlorimuron-ethyl e diclosulam serem seletivos para a cultura da soja, as variedades de soja apresentam tolerância diferencial para estes herbicidas (Newsom e Shaw, 1992; Leite et al., 2000; Merotto Jr., 2000; Belfry et al., 2015). Há relatos de chlorimuron-ethyl aplicado em pré-plantio provocando efeitos negativos na altura de plantas e rendimento (Newsom e Shaw, 1992), assim como em aplicações em pós-emergência (Fornazza et al., 2018). Entretanto, para algumas variedades, mesmo com aplicação do dobro da dose de chlorimuron-ethyl, não foram observados sintomas de fitointoxicação (Belfry et al., 2015).

Diferenciar variedades de soja quanto à tolerância ao chlorimuron-ethyl e diclosulam seria de grande valia a engenheiros agrônomos, agricultores e aos melhoristas de planta. Antes do advento da soja resistente ao glyphosate, as principais variedades sensíveis ou tolerantes eram conhecidas (Barros et al., 2005) e nas diversas etapas dos programas de melhoramento,

estes herbicidas eram utilizados, selecionando as variedades mais tolerantes. Porém estas variedades não estão mais disponíveis no mercado, além das atuais variedades apresentarem ciclo mais curto, de menos de 120 dias (Bezerra et al., 2017), o que pode dificultar a recuperação da planta pelos efeitos causados pelos herbicidas (Fornazza et al., 2018).

Aparentemente, a absorção influencia pouco a tolerância às imidazolinonas (Oliveira Jr., 2011) e, tampouco para thifensulfuron methyl (grupo químico sulfonilureias) (Brown et al., 1990). Entretanto, não há maiores estudos na literatura em relação ao chlorimuron-ethyl aplicado em pós-emergência. Desta forma, a hipótese do trabalho é que a absorção de chlorimuron-ethyl não difere entre as variedades sensível e tolerante e que os aminoácidos, leucina, isoleucina e valina e o ácido 2-aminobutírico funcionariam como marcadores químicos para diferenciar a sensibilidade entre variedades de soja a herbicidas inibidores da ALS. O objetivo do trabalho é determinar um método que permita distinguir a susceptibilidade de variedades de soja a chlorimuron-ethyl e diclosulam.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em dois experimentos, conduzidos em casa-de-vegetação. O experimento A foi realizado para avaliar as variedades de soja, MSOY 6410 IPRO e AS 3570 IPRO em relação à seletividade de chlorimuron-ethyl, aplicado em pós-emergência. O experimento B foi realizado a fim de verificar as variedades de soja, BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR, BMX Potência RR e BMX Energia RR, em relação à seletividade do diclosulam, aplicado em pré-emergência.

Experimento A – chlorimuron-ethyl

Em uma primeira etapa, duas variedades de soja foram avaliadas, MSOY 6410 IPRO e AS 3570 IPRO, as quais, em testes prévios em campo¹, apresentaram sensibilidade diferencial ao herbicida chlorimuron-ethyl. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Núcleo de Estudos Avançados em Ciência das Plantas Daninhas (NAPD) da Universidade Estadual de Maringá - PR, em março de 2017. MSOY 6410 IPRO apresenta hábito de crescimento indeterminado e grupo de maturação 6.4, o que significa ser precoce na macrorregião 2, região edafoclimática 201, ao passo que AS 3570 IPRO é de hábito de crescimento semideterminado

¹ Experimentos realizados pelo engenheiro agrônomo M.Sc. Luís Henrique Penckowski e equipe na Fundação ABC.

e grupo de maturação 5.7, portanto, uma variedade super-precoce, na macrorregião e região citadas anteriormente.

As variedades foram semeadas em vasos plásticos de 8,5 dm³, sendo cada vaso uma unidade experimental. O solo utilizado apresentou as seguintes características químicas e físicas: 1,2% de M.O.; pH_{H2O} de 6,1; 1,6 cmol_c dm⁻³ de H⁺+Al³⁺; 1,5 cmol_c dm⁻³ de Ca⁺²; 0,6 cmol_c dm⁻³ de Mg⁺²; 0,35 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 24,0 mg dm⁻³ de P (método resina); 7,0 g dm⁻³ de C; 49,4 % de areia grossa; 20,2 % de areia fina; 6,9 % de silte e 23,5 % de argila e foi preparado livre de torrões.

A aplicação do herbicida foi realizada em pós-emergência, quando as plantas estavam no estágio vegetativo V4, ou seja, terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida. Foram utilizadas a dose recomendada do herbicida (20 g ha⁻¹), o dobro da dose recomendada (40 g ha⁻¹) e quatro vezes a dose recomendada (80 g ha⁻¹), com adição de óleo mineral emulsionável (Assist) a 0,05% v/v (50 mL 100 L⁻¹), conforme recomendação do fabricante (Rodrigues e Almeida, 2008), além de uma testemunha não tratada. Para a aplicação do herbicida, foi utilizado pulverizador costal de pressão à base de CO₂, equipado com três pontas XR 110.02, espaçadas em 0,5 m entre si e posicionadas 0,5 m da superfície dos alvos, proporcionando uma taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹ de calda. A fitointoxicação foi avaliada visualmente aos 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) com notas percentuais. Foram atribuídas notas em comparação com o tratamento sem aplicação de herbicida, considerando zero para a ausência de sintomas e 100% para a morte da planta (SBCPD, 1995).

A primeira etapa do experimento A foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições. Os tratamentos compuseram um esquema fatorial 2 x 4, sendo o primeiro fator correspondente às duas variedades de soja (MSOY 6410 IPRO e AS 3570 IPRO) e o segundo fator foi constituído pelas quatro doses de chlorimuron-ethyl (0, 20, 40 e 80 g ha⁻¹).

Constatada a diferença entre as variedades, uma segunda etapa do experimento A foi instalada em novembro de 2017, a fim de analisar o teor do herbicida, dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, e do ácido 2-aminobutírico em plantas das duas variedades de soja submetidas à aplicação de chlorimuron-ethyl. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação em Maringá - PR as análises de laboratório foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (Nupam) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em Botucatu – SP.

A instalação do experimento foi conduzida como no primeiro experimento, em relação ao solo, vasos e estádio de desenvolvimento da planta no momento da aplicação. Em cada vaso, manteve-se somente uma planta, portanto cada vaso foi considerado uma unidade amostral. Para a aplicação, foi utilizada somente a dose de 20 g ha⁻¹ com adição de óleo mineral (Assist) a 0,05% v/v, com o cuidado de cobrir o solo para evitar a absorção do herbicida pelas raízes. Foram feitas coletas das folhas de plantas em três datas após a aplicação (um, dois e sete dias). A irrigação foi realizada manualmente com o cuidado de não molhar as folhas e evitar eventual absorção radicular do herbicida.

Para verificar se a absorção do herbicida é a causa da diferença de susceptibilidade entre variedades de soja, o teor externo de herbicida na planta foi determinado. Nas três datas após a aplicação (1, 2 e 7 dias), as folhas de cada planta foram destacadas e três lavagens foram feitas com aproximadamente 100 mL de água destilada. O líquido da lavagem foi homogeneizado e retirou-se uma alíquota de 40 mL para cada amostra. As amostras foram mantidas congeladas para posterior transporte até o laboratório, onde foram filtradas com filtro Millex HV de 0,45 µm com membrana Durapore de 13 mm e armazenadas em frasco âmbar para posterior quantificação do teor externo do herbicida na planta, não absorvido.

Para a quantificação do teor interno do herbicida (absorvido), do teor dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina e do ácido 2-aminobutírico, procedeu-se à secagem das folhas lavadas e estas foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em tubos de centrífuga, tipo “falcon” de 15 mL. Estes tubos foram congelados para transporte até o laboratório, onde foram submetidos ao freezer a -80°C por aproximadamente 30 minutos e, em seguida, ao processo de liofilização utilizando-se o liofilizador Christ Alpha 2-4 LD Plus a temperatura de -60°C durante 50 horas. Após liofilizadas, pesou-se uma alíquota de 100 mg da amostra em balança Shimadzu (AY220), com 0,0001g de precisão, e adicionou-se 10 mL de fase metanol (metanol e água deionizada na proporção 4:1 v/v), seguindo-se de banho ultrassônico com frequência de 42 kHz, a temperatura de 60 °C por 30 minutos. Terminado o banho de ultra-som, as amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos a 20 °C (centrífuga Rotanta 460R), sendo então o sobrenadante coletado e filtrado em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm com membrana durapore 13 mm e acondicionados em vial âmbar 9mm (Flow Supply) de capacidade de 2 mL para posterior quantificação por LC-MS/MS.

Para a quantificação, foi utilizado um sistema LC-MS/MS, com um Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) (Shimadzu, Prominence UFLC), equipado com duas

bombas LC-20AD, um autoinjeter SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema de controle CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e um forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna) acoplado a um espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) (AppliedBiosystems). As condições cromatográficas na quantificação do teor de chlorimuron-ethyl estão descritas na Tabela 1 e dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina na Tabela 2. O tempo de corrida foi de 10 minutos e o tempo de retenção para chlorimuron-ethyl foi de 5,21 minutos. Para os aminoácidos valina, leucina, isoleucina e o ácido 2-aminobutírico, o tempo de retenção foi de 3,12; 4,50; 4,20 e 2,78 minutos, respectivamente. A massa molecular e os fragmentos gerados de chlorimuron-ethyl foram de 415,071 (185,90; 184,80; 121,00).

Tabela 1. Condições cromatográficas para quantificação de chlorimuron-ethyl e diclosulam.

Coluna analítica	Synergi 2.5 μ Hydro-RP 100Å, (50 x 4,6 mm)
Fase móvel	Fase A (FA) = Água com 0,5% ácido acético Fase B (FB) = Metanol com 0,5% ácido acético
Gradiente	0 – 1 minuto = 60% FA e 40% FB 1 – 2,5 minutos = 60% FA e 40% FB 2,5 – 6 minutos = 5% FA e 95% FB 6-7,5 minutos = 5% FA e 95% FB 7,5-10 minutos = 60% FA e 40% FB
Fluxo	0,6 mL min ⁻¹

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos aminoácidos valina, leucina, isoleucina e o ácido 2-aminobutírico.

Coluna Analítica	Gemini 5 μ C18 110 Å (150 x 4,6 mm)
Fase móvel	Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	1min – 5% FB 95%FA 1,1 min – 85% FB 15%FA 5,0 min – 85% FB 15%FA 7,0 min – Fim
Fluxo	0,25 mL min ⁻¹

Os dados de lavagem das folhas são expressos pela relação teor interno/(teor interno + teor externo do herbicida). Os demais dados são expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido. Os dados de isoleucina e leucina foram considerados em conjunto, pois a massa molecular de ambos os aminoácidos é muito similar, sendo 131,175 g mol^{-1} para os dois (PubChem, 2019) e não há precisão analítica para diferenciar isoleucina e leucina. Para estes dois aminoácidos será utilizado a sigla [iso+leu] ao longo do texto.

A segunda etapa do experimento A foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições. Para os dados de lavagem das folhas e de teor interno do herbicida, foram considerados somente as plantas que receberam a aplicação do herbicida, totalizando 36 parcelas. Os tratamentos compuseram um esquema fatorial 2 x 3, sendo o primeiro fator correspondente às duas variedades de soja (MSOY 6410 IPRO aplicado e AS 3570 IPRO aplicado) e o segundo fator foi constituído pelos três momentos de coleta da planta (1, 2 e 7 DAA). Para os dados de [iso+leu], valina e ácido 2-aminobutírico, os tratamentos compuseram em um esquema fatorial 4 x 3, sendo o primeiro fator correspondente aos quatro tratamentos às variedades de soja (MSOY 6410 IPRO testemunha, MSOY 6410 IPRO aplicado, AS 3570 IPRO testemunha e AS 3570 IPRO aplicado) e o segundo fator foi constituído pelos três momentos de coleta da planta (1, 2 e 7 DAA), totalizando 72 parcelas.

Experimento B – diclosulam

O experimento B teve o propósito de analisar os efeitos da aplicação em pré-emergência de diclosulam nos teores do herbicida, dos aminoácidos de cadeia ramificada e do ácido 2-aminobutírico em variedades de soja.

Quatro variedades de soja, BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR, BMX Potência RR e BMX Energia RR, as quais, em testes prévios em campo², apresentaram sensibilidade diferencial ao diclosulam, sendo as duas primeiras sensíveis e as duas últimas tolerantes. As variedades BMX Vanguarda RR e BMX Força RR são respectivamente dos grupos 6.0 e 6.2, sendo consideradas precoces; a variedade BMX Potência pertence ao grupo 6.7, considerada ciclo semiprecoce e a variedade BMX Energia RR é do grupo de maturação 5.0, sendo considerada de ciclo super-precoce, na macrorregião e região citadas anteriormente. Todas as variedades apresentam crescimento indeterminado. O experimento foi instalado em agosto de 2017.

Foram utilizadas as mesmas condições experimentais, exceto pelo uso de vasos de 5 dm³ pois as plantas seriam coletadas em estágio de desenvolvimento mais jovens. Em cada vaso, três plantas foram deixadas e o conjunto delas formaram uma unidade experimental.

A aplicação foi realizada em pré-emergência, com o cuidado de semear, irrigar e aplicar. A dose recomendada do herbicida (35 g ha⁻¹) foi utilizada. A avaliação visual de fitointoxicação também foi realizada, conforme detalhada no experimento do chlorimuron-

² Experimentos realizados pelo engenheiro agrônomo M.Sc. Luís Henrique Penckowski e equipe na Fundação ABC.

ethyl. Foram feitas coletas de cotilédones e folhas das plantas em dois momentos, uma no estágio de emissão do par de folhas unifolioladas (15 DAA) e a segunda no estágio de emissão do primeiro trifólio (21 DAA).

As quantificações dos teores internos do herbicida, dos teores dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina e do ácido 2-aminobutírico foram realizadas conforme descritos no experimento A.

As condições cromatográficas na quantificação do teor de diclosulam são idênticas às descritas para o chlorimuron-ethyl (Tabela 1). O tempo de corrida foi de 10 minutos e o tempo de retenção para diclosulam foi de 5,32 minutos. A massa molecular e os fragmentos gerados de diclosulam foram de 405,862 (161,10; 377,90; 124,90).

O experimento B foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições. Os tratamentos compuseram um esquema fatorial 8 x 2, sendo o primeiro fator correspondente aos oito tratamentos às variedades de soja (BMX Vanguarda IPRO testemunha, BMX Vanguarda IPRO aplicado, BMX Força RR testemunha, BMX Força RR aplicado, BMX Potência RR testemunha, BMX Potência RR aplicado, BMX Energia RR testemunha e BMX Energia RR aplicado) e dois momentos de coleta (unifoliolado e primeiro trifólio).

Análise estatística

Os dados dos experimentos A e B foram submetidos à análise de variância, após a verificação da homogeneidade de variância pela análise gráfico dos resíduos. As comparações entre as médias foram submetidas ao teste t (LSD) a 10%. A análise estatística foi computada utilizando-se o PROC GLM e PROC GENMOD SAS (versão 9.4; SAS Institute, Inc. Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento A – chlorimuron-ethyl em pós-emergência

Na primeira etapa, no experimento de avaliação da sensibilidade diferencial de variedades de soja ao herbicida, a interação entre variedades e doses foi significativa. A fitointoxicação aos 7 e 14 dias possibilitou discriminar as variedades (Tabela 3). A variedade MSOY 6410 IPRO apresentou notas de fitointoxicação gradualmente mais altas, com o aumento da dose, enquanto que a variedade AS 3570 IPRO não apresentou fitointoxicação, mesmo quando submetida a doses equivalentes à quatro vezes a recomendada. Sintomas como paralização de crescimento, clorose, deformação nas margens da folha e arroxamento das nervuras na face abaxial foram observados na variedade MSOY 6410 IPRO (Figura 1). Plantas

tratadas com inibidores da ALS comumente cessam o crescimento e apresentam o arroxamento, devido à acumulação de antocianinas produzidas pelo estresse (Duke e Dayan, 2011). Desta forma, a partir da primeira etapa foi possível discriminar as variedades, sendo MSOY 6410 IPRO considerada sensível e AS 3570 IPRO considerada tolerante ao chlorimuron-ethyl.

Tabela 3. Notas de fitointoxicação (%) aos 7 e 14 dias após a aplicação de chlorimuron-ethyl para duas variedades de soja e em quatro doses. Maringá – PR, 2018.

Fitointoxicação 7 DAA				
Variedades	Doses			
	0	20 (1x)	40 (2x)	80 (4x)
g ha ⁻¹			
MSOY 6410 IPRO	0,00 Ad	20,83 Ac	35,00 Ab	60,00 Aa
AS 3570 IPRO	0,00 Aa	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
Fitointoxicação 14 DAA				
Variedades	Doses			
	0	20 (1x)	40 (2x)	80 (4x)
g ha ⁻¹			
MSOY 6410 IPRO	0,00 Ad	18,33 Ac	40,00 Ab	65,00 Aa
AS 3570 IPRO	0,00 Aa	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram pelo teste t (LSD) a 10%.



Figura 1. Sintomas de fitointoxicação causadas por chlorimuron-ethyl em doses crescentes na variedade sensível, MSOY 6410 IPRO e tolerante, AS 3570 IPRO, aos 14 dias após a aplicação. Maringá - PR.

Na segunda etapa do experimento A, procurou-se verificar se a absorção do herbicida é o fator que diferencia as variedades quanto à tolerância ao chlorimuron-ethyl. Ao verificar a análise de variância, observa-se que tanto o fator variedade quanto a interação entre variedade e coleta não foram significativos (Tabela 4). Este resultado demonstra que não existem diferenças significativas para a absorção de chlorimuron-ethyl entre variedades e, tampouco a interação entre variedades e coleta. Resultados similares foram encontrados por Brown et al. (1990), os quais encontraram absorção foliar de thifensulfuron methyl semelhante ou até mesmo superior em soja (tolerante) em comparação à *Amaranthus retroflexus* L. e *Chenopodium album* L (suscetíveis). Os valores de absorção encontrados em função da coleta foram da ordem de 0,2706; 0,1426 e 0,1284 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de tecido respectivamente após 1, 2 e 7 DAA.

Tabela 4. Análise de variância para absorção de chlorimuron-ethyl nas folhas para variedade, coleta e a interação entre os dois fatores. Maringá – PR, 2018.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Variedades	1	0,0040	0,0040	1,45	0,2387
Coletas	2	0,1440	0,0720	26,24	< 0,0001
Variedades x Coletas	2	0,0040	0,0020	0,72	0,4938
Erro	30	0,0796	0,0027		
Total	35	0,2340			

Para a variável resposta teor interno de herbicida, o fator de variedade e a interação entre os fatores variedades e momento de coleta não foram significativos, somente o fator momento de coleta apresentou diferenças significativas, assim como observado na variável absorção. Inicialmente, aos 1 DAA, os teores de chlorimuron-ethyl nas plantas estavam em aproximadamente $1,60 \mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, sendo que aos 2 DAA estes teores diminuíram para $0,82 \mu\text{g g}^{-1}$ de tecido e aos 7 DAA estes teores estavam em $0,54 \mu\text{g g}^{-1}$ de tecido (Figura 2). Observou-se, portanto, uma diminuição gradual do herbicida na planta ao longo dos momentos de coleta. Isto provavelmente se deve à metabolização do chlorimuron-ethyl. Em experimento de Wilcut et al. (1989), 42,4% de metabólitos totais foram recuperados um dia após a aplicação do ^{14}C -chlorimuron-ethyl aplicado em pós-emergência em plantas de soja e 68,3% de metabólitos totais em três dias após a aplicação. A metabolização do herbicida na soja se dá por conjugação e desesterificação (Brown e Neighbors, 1987).

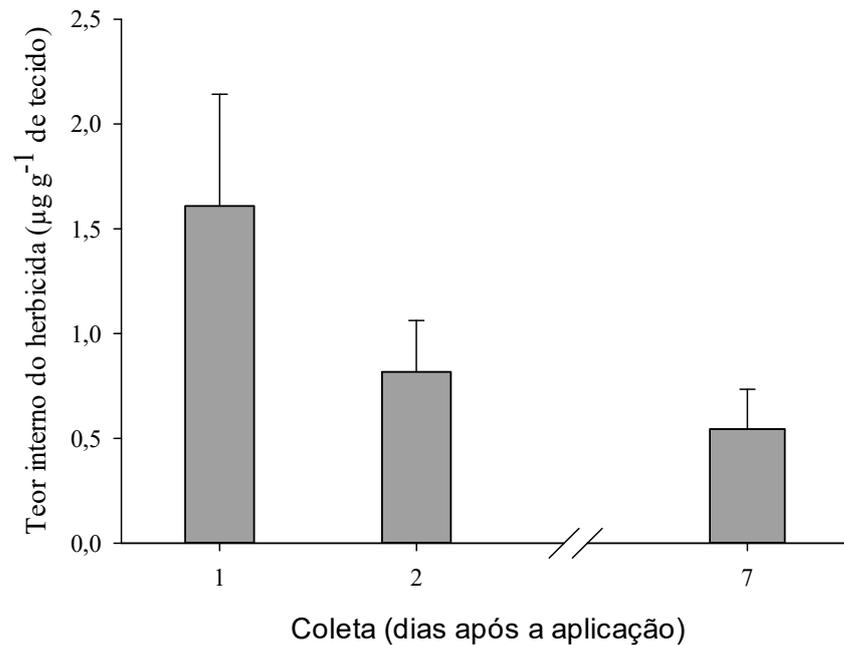


Figura 2. Teor interno de chlorimuron-ethyl nas folhas de plantas de soja em função de momento da coleta após a aplicação de chlorimuron-ethyl. As barras representam os desvios padrão.

Na avaliação das variáveis-resposta seguintes: [iso+leu], valina e ácido 2-aminobutírico, a interação entre os fatores variedades e momento de coleta foi significativa. Para o objetivo do estudo, é de maior interesse somente o desdobramento de variedades dentro de cada coleta, o qual é exposto a seguir.

Em relação aos teores de [iso+leu], observa-se que a variedade sensível MSOY 6410 IPRO sem aplicação apresentou teores inferiores aos um e dois dias em relação à testemunha da variedade tolerante AS 3570 IPRO (Figura 3A). A variedade sensível apresentou teores de 29,47 e 31,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido aos um e dois dias, respectivamente, enquanto que a variedade tolerante apresentou teores de 36,07 e 41,73 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, respectivamente. Dessa forma, o teor destes aminoácidos no estágio de terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida pode ser considerado um indicador da sensibilidade diferencial de variedades de soja ao chlorimuron-ethyl. Para o estágio seguinte de desenvolvimento da planta (7 DAA) não houve diferenças.

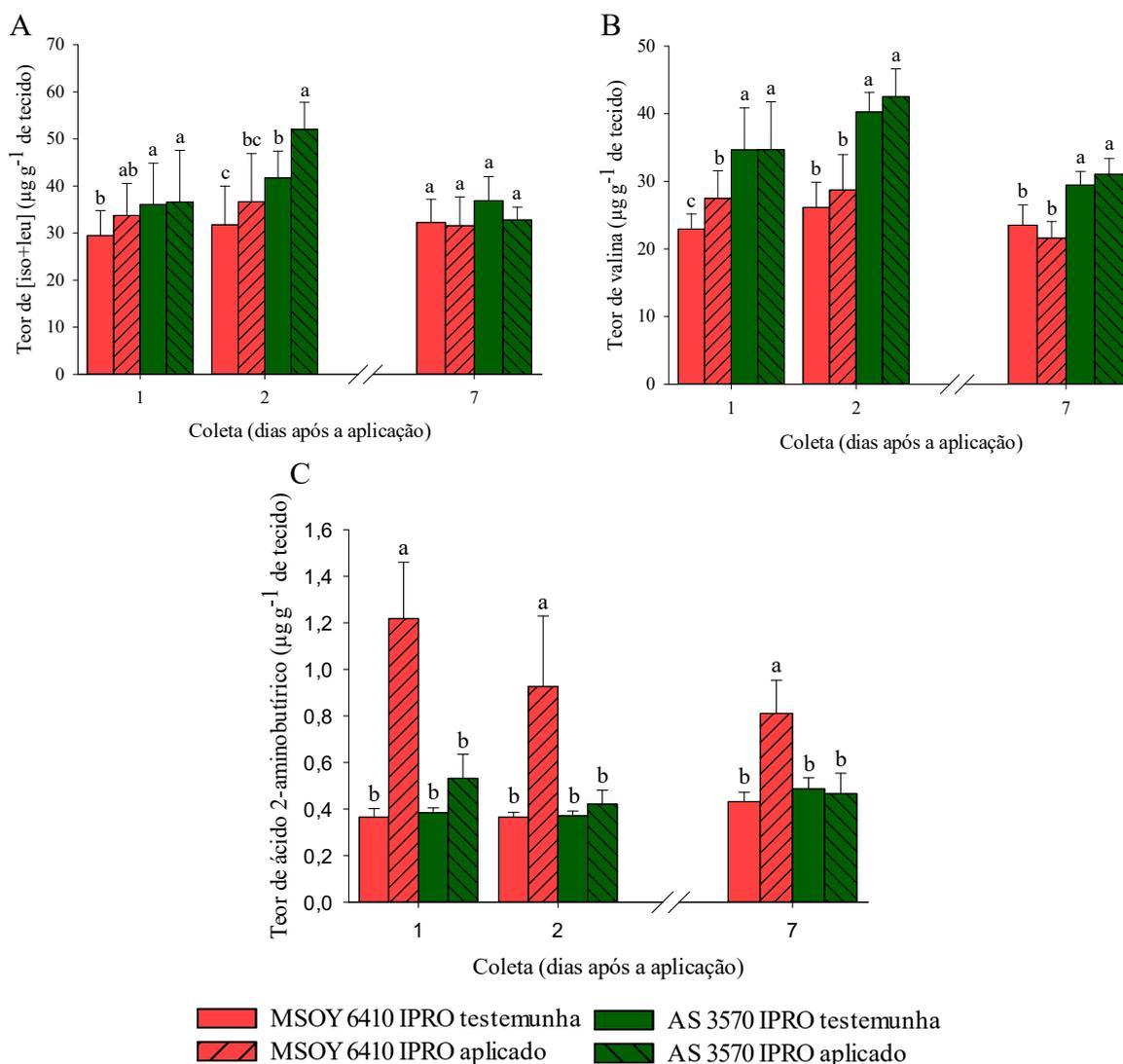


Figura 3. Teores de [iso+leu] (A), valina (B) e ácido 2-aminobutírico (C) nas folhas de plantas de soja em função de variedades e momento da coleta após a aplicação de chlorimuron-ethyl. As comparações são apenas dentro de cada momento de coleta. Letras iguais nas colunas não diferem entre si, a 10% de probabilidade pelo teste t. As barras representam os desvios padrão.

Nos tratamentos com aplicação herbicida, não foram observadas diminuições dos teores de [iso+leu], em comparação às respectivas testemunhas, apesar do efeito trivial dos inibidores da ALS ser a inibição da produção de aminoácidos de cadeia ramificada. Ao contrário, os teores de [iso+leu] mantiveram-se inalterados ou com aumento em comparação ao tratamento com a aplicação, como se observou aos 2 DAA na variedade tolerante.

Na avaliação do teor de valina, a variedade sensível apresentou novamente valores inferiores em relação à variedade tolerante, sem a aplicação de chlorimuron-ethyl, ao longo dos períodos avaliados (Figura 3B). Um dia após a aplicação, a MSOY 6410 IPRO apresentou em

média teores de 22,95 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, enquanto que a AS 3570 IPRO apresentou 34,66 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, ou seja, a variedade tolerante teve naturalmente 51,02% a mais de valina em comparação à variedade sensível. Dois dias após a aplicação, o teor encontrado na variedade sensível foi de 26,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, ao passo que na variedade tolerante foi 40,250 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, portanto 53,92% a mais de valina na variedade tolerante. Sete dias após a aplicação, apesar de uma diferença menos discrepante, a variedade sensível ainda apresentou valores inferiores em relação à variedade tolerante, sendo de 23,53 e 29,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, respectivamente. De fato, a correlação entre as notas de fitointoxicação aos 7 DAA e os teores de valina nas duas variedades aplicadas foi de -0,79, o que indica que em menores notas de fitointoxicação, encontra-se elevados teores de valina. Portanto na variedade tolerante, que apresentou notas nulas de fitointoxicação, há altos teores de valina. Assim, sugere-se que a rota de produção de valina na variedade tolerante é mais ativa do que na variedade sensível, dessa forma, é necessário mais herbicida para bloquear a enzima. O maior teor de valina observado nas plantas tolerantes pode estar relacionado com a disponibilidade de piruvato para sua síntese. O piruvato utilizado para a síntese de valina pode ser sintetizado a partir de uma gama de reações, mas a isoleucina é sintetizada somente a partir do 2-cetobutirato produzido na reação da treonina desaminase (Coruzzi et al., 2015). A tolerância da variedade pode envolver o metabolismo de carboidratos.

A biossíntese de valina e leucina compartilham uma rota semelhante, com um mesmo precursor, o piruvato, enquanto que a isoleucina é produzida por uma rota distinta, com o precursor 2-cetobutirato. A isoleucina é sintetizada a partir da treonina, por uma série de reações. No primeiro passo da via de síntese de isoleucina, atua a enzima treonina desaminase, que é inibida pelo produto final da via, porém, é ativada por valina. Esta enzima é regulada alostericamente e a relação entre isoleucina e valina é competitiva (Miyajima; Shiio, 1972). Como a valina é ativadora da enzima, conseqüentemente há maior produção de isoleucina. Em uma análise de correlação simples de Pearson entre os teores de valina e [iso+leu], obteve-se $r = 0,7586$, portanto, há uma relação linear e positiva; conforme aumenta o teor de valina, aumenta também o teor de [iso+leu]. Observa-se na comparação entre as variedades com aplicação do herbicida, que o teor de [iso+leu] na variedade tolerante foi maior do que na variedade sensível. Os maiores teores dos aminoácidos sugerem uma rota de síntese destes aminoácidos mais ativa e, conseqüentemente, demandam mais herbicida para ser inibida. Sugere-se que a avaliação de teor de aminoácidos valina, leucina e isoleucina podem ser

utilizadas para realizar uma triagem de variedades de soja quanto à tolerância ao chlorimuron-ethyl, na ausência de aplicação.

Após a aplicação de herbicida, foi observado aumento dos teores de aminoácidos em alguns casos, como no teor de [iso+leu] aos 2 DAA na variedade tolerante e no teor de valina ao 1 DAA na variedade sensível. Após a aplicação de chlorimuron-ethyl em plantas de milho e trigo, foram observados decréscimos nos teores de proteínas solúveis (Nemat Alla et al., 2008). Segundo estes autores, há aumento das proteólises pelas proteases, responsáveis pela degradação de proteínas, resultando no aumento de aminoácidos e, conseqüentemente, de N-solúvel. As proteases agem nas plantas para fornecer aminoácidos que não podem ser sintetizados devido à ação do herbicida (Rhodes et al., 1987; Zabalza et al., 2013; Zulet et al., 2013 e Meriem et al., 2016). Entretanto, para confirmar esta hipótese, a análise de aminoácidos totais e de proteínas totais deve ser realizada. Este mecanismo de aumento de aminoácidos após a aplicação de herbicida, pode ser um sistema de defesa natural da planta. Yu et al. (2017) Dentre as proteínas e enzimas identificadas por Yu et al. (2017) em soja sensível e tolerante tratadas com metsulfuron methyl, 22,9% eram referentes à defesa ao estresse. Estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas no teor de valina na variedade tolerante após a aplicação de herbicida.

Em relação ao teor de ácido 2-aminobutírico (Figura 3C), a variedade sensível MSOY 6410 IPRO, que recebeu a aplicação de chlorimuron-ethyl, apresentou um maior teor em comparação à respectiva testemunha. Enquanto que a testemunha da variedade sensível apresentou 0,36; 0,36 e 0,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido aos 1, 2 e 7 DAA, respectivamente, as plantas dos vasos que receberam tratamento herbicida apresentaram 1,39; 1,14 e 0,81 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido; ou seja, um incremento de 281,7; 211,8 e 87,95%, respectivamente. Em experimento com batata (*Solanum tuberosum* L., var. 'Russet Burbank' e 'Shepody'), o máximo de acúmulo de ácido 2-aminobutírico foi obtido com 24 a 48 horas após a aplicação de rimsulfuron e thifensulfuron-methyl (Loper et al., 2002), similarmente ao encontrado em nossos dados. Em contrapartida, para a variedade tolerante, AS 3570 IPRO, não houve diferenças significativas entre a testemunha e o tratamento que recebeu a aplicação. A correlação de Pearson entre as notas de fitointoxicação e o ácido 2-aminobutírico, considerando somente as variedades que receberam aplicação é de 0,832, indicando uma associação positiva. Portanto, à medida que há aumento de notas de fitointoxicação, há também o aumento dos teores do ácido 2-aminobutírico. O aumento destes teores somente na variedade sensível sugere uma enzima mais tolerante na variedade tolerante.

A análise do ácido 2-aminobutírico pode ser utilizada para verificar a sensibilidade de variedades de soja antes de apresentar sintomas. Além disso, há potencial para uso na verificação de plantas daninhas resistentes (Loper et al., 2002).

Assim, a tolerância de variedades de soja ao chlorimuron-ethyl pode ser avaliada por meio da quantificação de aminoácidos, quando as plantas estiverem no estágio vegetativo V4, ou seja, terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida (2 DAA). Se a aplicação de herbicida for utilizada, a metodologia de análise do ácido 2-aminobutírico é uma ferramenta que permite confirmar a tolerância e pode ser utilizada até uma semana após a aplicação do herbicida.

Para uma validação do método, experimentos adicionais devem ser conduzidos, avaliando um número maior de variedades para se estabelecer valores que pudessem ser considerados o limiar entre sensível e tolerante.

Experimento B – diclosulam em pré-emergência

No experimento de diclosulam, nos dois estádios de coleta de plantas, as plantas apresentavam desenvolvimento normal, sem sintomas de fitointoxicação causados pelo herbicida. Desta forma, em todas as variedades estudadas e nos estádios avaliados, as notas de fitointoxicação foram zero.

A análise do teor de diclosulam nas folhas de soja, em nenhuma das fontes de variação, variedade, momento de coleta ou a interação dos dois fatores apresentou efeitos significativos. De fato, observa-se que a maior frequência de dados obtidos, 82,29%, foi referente ao valor 0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido, com predominância de níveis muito baixos ou inexistentes e somente 1 ou 2% dos dados para os demais valores, principalmente nos maiores teores de 0,01445 a 0,01565 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido (Figura 4). Portanto, o teor de herbicida na parte aérea quando o herbicida é aplicado em pré-emergência, é aproximadamente nulo nos estádios de unifoliolado e 1º trifólio em plantas de soja, nas variedades avaliadas.

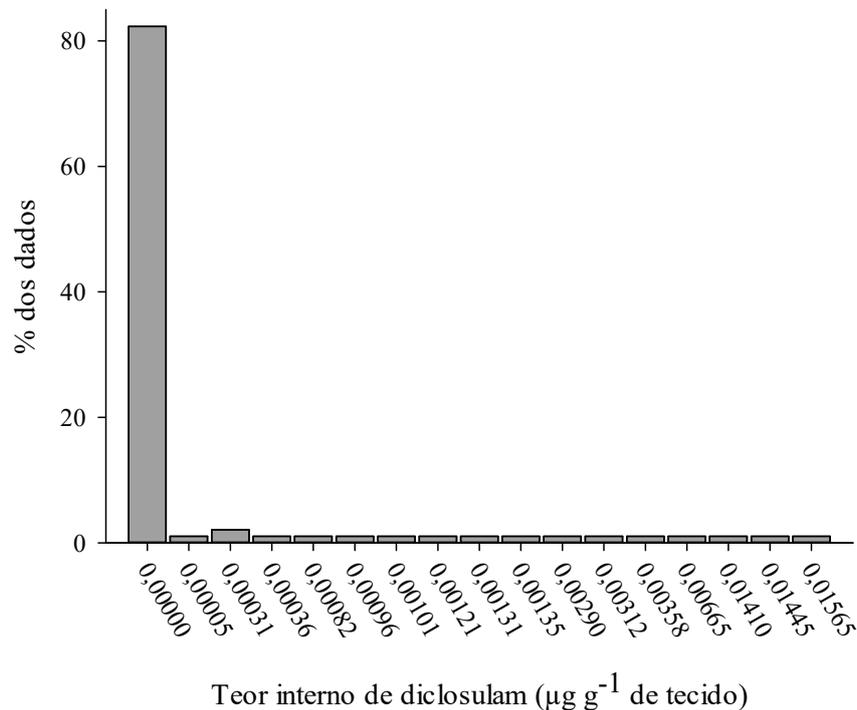


Figura 4. Frequência de dados de teor de diclosulam nas folhas de soja.

Ao contrário dos resultados encontrados no experimento com chlorimuron-ethyl, não foram encontrados resultados consistentes de variedades sensíveis e tolerantes no experimento em pré-emergência com diclosulam. De fato, não foram observados sintomas de fitointoxicação evidentes que diferenciasssem as variedades.

No estágio de folhas unifolioladas, a testemunha de BMX Potência que poderia ser uma variedade tolerante, conforme testes prévios em campo, apresentou teor de [iso+leu] e valina semelhantes aos das variedades sensíveis. A outra variedade potencialmente tolerante, BMX Energia RR, na testemunha apresentou teor de [iso+leu] superior às demais variedades (Figura 5A), porém com teor inferior na avaliação de valina (Figura 5B). Ao passar para o estágio de primeiro trifólio, não existem diferenças entre as variedades, na comparação entre as testemunhas, em ambas as avaliações.

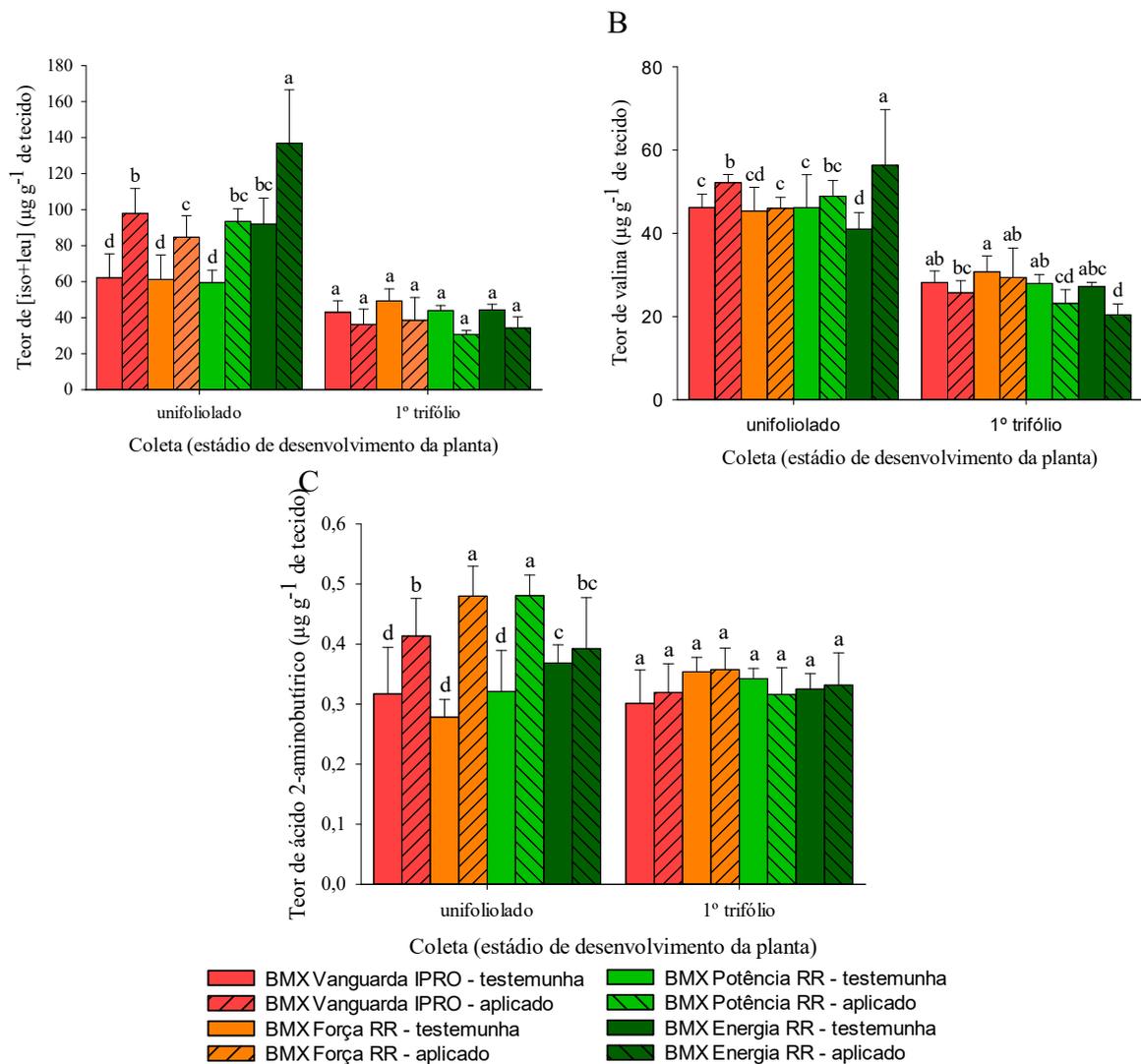


Figura 5. Teores internos de [iso+leu] (A), valina (B) e ácido 2-aminobutírico (C) nas folhas de plantas de soja em função de variedades e momento da coleta após a aplicação de diclosulam. As comparações são apenas dentro de cada momento de coleta. Letras iguais nas colunas não diferem entre si, a 10% de probabilidade pelo teste t. As barras representam os desvios padrão.

Os tratamentos que receberam aplicação de herbicida, resultaram em aumento do teor de isoleucina e leucina, em comparação aos respectivos tratamentos testemunhas, no estágio de plantas unifolioladas. Supõe-se que este aumento seja resultado das proteólises (Nemat Alla et al., 2008; Zabalza et al., 2013; Zulet et al., 2013 e Meriem et al., 2016), como mencionado no experimento A. Entretanto, estes teores mantiveram-se semelhantes às testemunhas sem herbicida nas plantas coletadas no estágio de primeiro trifólio.

Na avaliação do teor do ácido 2-aminobutírico (Figura 5C), os teores aumentaram nas variedades BMX Vanguarda IPRO, BMX Força RR e BMX Potência RR que receberam o herbicida, em comparação às respectivas testemunhas sem herbicida no estágio de folha

unifoliolada. Para a variedade BMX Energia RR também foi observado aumento nos teores de ácido 2-aminobutírico, porém, pouco expressivo e sem diferenças estatisticamente. A avaliação do teor de ácido 2-aminobutírico permite inferir que o herbicida agiu na planta mesmo com teores de herbicida encontrados na parte aérea da planta praticamente nulos. Sugere-se que o diclosulam tenha sido metabolizado. A metabolização em soja do herbicida N-(2,6-dichlorophenyl)-5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine-2-sulfonamide também do grupo químico triazolopirimidinas ocorre pela hidroxilação do grupo alquil e conjugação com glicose (Gerwick et al., 1994). No estágio de primeiro trifólio, as variedades não apresentaram diferenças entre si.

Como a tolerância da soja a triazolopirimidinas é significativamente maior em pré do que em pós-emergência (Oliveira Jr., 2011) e o diclosulam também é absorvido via foliar (Grey e Prosko, 2015), supõe-se que um novo experimento com a aplicação em pós-emergência possa discriminar a sensibilidade das variedades de soja. A aplicação nas folhas também permitiria evitar um possível efeito de alteração na concentração de herbicida no solo devido aos diferentes tipos de solo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que a quantificação de aminoácidos valina, leucina e isoleucina quando as plantas estiverem no estágio vegetativo V4 pode ser um indicativo da tolerância de variedades de soja ao chlorimuron-ethyl.

Se a aplicação de herbicida for utilizada, com a análise do ácido 2-aminobutírico há confirmação da tolerância e pode ser utilizada até sete dias após a aplicação do herbicida.

Para a tolerância de variedades de soja ao diclosulam, ainda é necessária uma adequação de metodologia.

REFERÊNCIAS

- BARROS, A. C.; MONTEIRO, P. M. F. O.; FURTADO, X. C.; NUNES JÚNIOR, J.; GUERZONI, R. A. Tolerância de cultivares de soja aos herbicidas imazaquin, diclosulam e sulfentrazone, aplicados em solo de textura arenosa. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005.
- BELFRY, K. D.; SOLTANI, N.; BROWN, L. R. SIKKEMA, P. H. Tolerance of identity preserved soybean cultivars to preemergence herbicides. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 95, n. 4, p. 719-726, 2015.
- BEZERRA, A. R. G.; SEDIYAMA, T.; SILVA, F. L.; BORÉM, A.; SILVA, A. F.; SILVA, F. C. S. Agronomical aspects of the development of cultivars. In: SILVA, F. L.; BORÉM, A.; SEDIYAMA, T.; LUDKE, W. H. (eds.). **Soybean Breeding**. Gewerbestrasse: Springer, 2017. p. 395-411.
- BRESSANIN, F. N.; JAYME NETO, N.; MARTINS, J. F.; MARTINS, J. V. F.; ALVES, P. L. C. A. Controle de biótipos resistentes de *Conyza bonariensis* com glyphosate + clorimuron-etílico em função do estágio de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 68-72, 2014.
- BROWN, H. M.; NEIGHBORS, S. M. Soybean metabolism of chlorimuron ethyl: physiological basis for soybean selectivity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 2, p. 112-120, 1987.
- BROWN, H. M.; WITTENBACH, V. A.; FORNEY, D. R.; STRACHAN, S. D. Basis for soybean tolerance to thifensulfuron methyl. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 303-313, 1990.
- COBB, A. H.; READE, J. P. H. The Inhibition of Amino Acid Biosynthesis. In: _____. **Herbicides and Plant Physiology**. 2 ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 176-199.
- CORUZZI, G.; LAST, R.; DUDAREVA, N.; AMRHEIN, N. Amino Acids. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2 ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 289-336.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Bioactivity of herbicides. In: MOO-YOUNG, M. (ed.) **Comprehensive Biotechnology**. 2 ed. v. 4. Amsterdam: Elsevier Press, 2011. p. 23-35.

FORNAZZA, F. G. F.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, F. G.; OLIVEIRA Jr., R. S.; SILVA, G. D.; RIOS, F. A. Selectivity of pre-and post-emergence herbicides to very-early maturing soybean cultivars. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 4, p. 649-658, 2018.

GARCIA, M. D.; NOUWENS, A.; LONHIENNE, T. G.; GUDDAT, L. W. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 7, p. E1091-E1100, 2017.

GERWICK, B. C.; DEBOER, G. J.; SCHMITZER, P. R. Mechanisms of Tolerance to Triazolopyrimidine Sulfonanilide Herbicides. In: STETTER, J. (ed) **Herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis**. 1 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.145-160.

GIARDINA, M. C.; CAROSI, S. Effects of chlorsulfuron on polyamine content in maize seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 36, p. 229-236, 1990.

GREY, T. L.; PROSTKO, E. P. Uptake, translocation, and dose response of postemergence applied diclosulam to bristly starbur (*Acanthospermum hispidum*). **Peanut Science**, v. 42, p. 23-29, 2015.

HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. Weeds resistant to the herbicide diclosulam. Disponível em: <http://www.weedscience.org/Summary/ResistbyActive.aspx>, acesso em 30 jan. 2019.

LEITE, C. R. F.; ALMEIDA, J. C. V.; PRETE, C. E. C. Sensibilidades de cultivares de soja (*Glycine max*) aos herbicidas diclosulam e flumetsulam. **Planta Daninha**, v. 18, n. 1, p. 103-122, 2000.

LI, Y. Z.; WANG, C. Y. 2-Aminobutyric acid as a chemical marker for the detection of sulfonylurea herbicides. **Weed Technology**, v. 19, n. 1, p. 176-182, 2005.

LONHIENNE, T.; GARCIA, M. D.; PIERENS, G.; MOBILI, M.; NOUWENS, A.; GUDDAT, L. W. Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 9, p. E1945–E1954, 2018.

LOPER, B. R.; COBB, W. T.; ANDERSON, K. A. Chemical marker for ALS-inhibitor herbicides: 2-aminobutyric acid proportional in sub-lethal applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2601-2606, 2002.

MERIEM, F.; LEILA, M. A.; NOUDJOUR, G.; NABILA, M.; MAROUA, B.; REDA, D. M. Phytotoxic effects of a sulfonylurea herbicide on two varieties of durum wheat (*Triticum durum* Desf). **International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 159-168, 2016.

MEROTTO Jr., A.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. Tolerância da cultivar de soja Coodetec 201 aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v. 18, n. 1, p. 93-102, 2000.

MIYAJIMA, R.; SHIIO, I. Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*: VI. Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and its formation. **The Journal of Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 951-960, 1972.

NEMAT ALLA, M. M.; BADAWI, A. M.; HASSAN, N. M.; EL-BASTAWISY, Z. M.; BADRAN, E. G. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90 p. 8-18, 2008.

NEWSOM, L. J.; SHAW, D. R. Soybean (*Glycine max*) response to chlorimuron and imazaquin as influenced by soil moisture. **Weed Technology**, v. 6, n. 2, p. 389-395, 1992.

OLIVEIRA Jr., R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In.: OLIVEIRA Jr., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (eds) **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 141-191.

PubChem Compound Database; CID=6106 - National Center for Biotechnology Information.
Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6106>. Acesso em: 5 fev. 2019.

RHODES, D.; HOGAN, A.; DEAL, L.; JAMIESON, G.; HOWARTH, P. Amino acid metabolism of *Lemna minor* L. responses to chlorsulfuron. **Plant Physiology**, v. 84, p. 775-780, 1987.

RIEDER, G.; BUCHHOLTZ, K. P.; KUST, C. A. Uptake of herbicides by soybean seed. **Weed Science**, v. 18, n. 1, p. 101-105, 1970.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 7 ed. Londrina: Edição dos autores, 2018. 764 p.

ROST, T. The comparative cell cycle and metabolic effects of chemical treatments on root tip meristems. III. Chlorsulfuron. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 3, n. 1-4, p. 51-63, 1984.

SANTOS, G.; OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, A. C.; OSIPE, J. B. Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl and to glyphosate. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 409-416, 2014.

SBCPD – Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina: SBCPD, 1995. 42 p.

SHANER, D. L.; SINGH, B. K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1221-1226, 1993.

WILCUT, J. W.; WEHTJE, G. R.; PATTERSON, M. G.; COLE, T. A.; HICKS, T. V. Absorption, translocation, and metabolism of foliar-applied chlorimuron in soybeans (*Glycine max*), peanuts (*Arachis hypogaea*), and selected weeds. **Weed Science**, v. 37, n. 2, p. 175-180, 1989.

YU, X.; YANG, A.; JAMES, A. T. Selecting soybeans for sulfonylurea herbicide tolerance: a comparative proteomic study of seed germinations. **Crop & Pasture Science**, v. 68, n. 1, p. 27-32, 2017.

ZABALZA, A.; AMAIA, Z.; GIL-MONREAL, M.; IGAL, M.; ROYUELA, M. Branched-chain amino acid biosynthesis inhibitors: Herbicide efficacy is associated with an induced carbon-nitrogen imbalance. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 814-821, 2013.

ZHAO, L. J.; XIE, J. F.; ZHANG, H.; WANG, Z. T.; FAN, R. J.; LV, J. L.; ZHANG, M. Changes in metabolites in maize seedlings under chlorsulfuron and cadmium stress. **The Journal of Agricultural Science**, v. 154, p. 890-913, 2016.

ZULET, A.; GIL-MONREAL, M.; VILLAMOR, J. G.; ZABALZA, A.; van der HOORN, R. A. L.; ROYUELA, M. Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. e73847, 2013.

CAPÍTULO 2

Avaliação da tolerância diferencial de variedades de soja ao sulfentrazone por meio de quantificação do herbicida na seiva

Avaliação da tolerância diferencial de variedades de soja ao sulfentrazone por meio de quantificação do herbicida na seiva

RESUMO

Apesar do sulfentrazone, um inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox), ser um dos herbicidas mais eficazes no controle de plantas daninhas, é notório que há diferença entre variedades de soja na tolerância a este produto. Uma alternativa é desenvolver um teste que possibilite determinar a sensibilidade de uma forma precisa. O objetivo do trabalho é desenvolver um protocolo para identificação de variedades de soja sensíveis ao sulfentrazone. Em um primeiro experimento foi verificada a susceptibilidade de duas variedades de soja, V-TOP RR e BRS 284, a doses crescentes de sulfentrazone aplicadas em pré-emergência. Após constatação de redução de altura de plantas, de comprimento de raiz, de massa seca de parte aérea e raiz da variedade V-TOP RR, esta variedade foi definida como padrão sensível, enquanto que a BRS 284 foi definida como padrão tolerante. No segundo experimento, as mesmas variedades foram utilizadas, além de uma terceira variedade, a NA 5909 RG. Aos 21 dias após a aplicação, a seiva do xilema foi extraída por uma câmara de pressão e a concentração de sulfentrazone foi determinada por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Plantas da variedade sensível, com menor dimensão e massa seca, apresentaram os maiores teores de sulfentrazone na seiva, com 160,36% a mais do que a variedade tolerante. Conclui-se que a metodologia de quantificação do herbicida na seiva pode servir como teste na discriminação das variedades, e desta forma, classificou-se três níveis de sensibilidade ao sulfentrazone, sendo a V-TOP RR sensível, NA 5909 RG intermediária e BRS 284 tolerante.

Palavra-chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Inibidor da PROTOX. Aril-triazolinonas. Absorção.

Evaluation of the differential tolerance of soybean varieties to sulfentrazone by quantification of the herbicide in the sap

ABSTRACT

Although sulfentrazone, an inhibitor of the enzyme protoporphyrinogen oxidase, is one of the most effective weed control herbicides, it is known that there is a difference between soybean varieties in tolerance to this product. An alternative is to develop a rapid test that allows to determine sensitivity in a quick and accurate manner. The aim of the work is to develop a protocol to identify sensitive soybean varieties to sulfentrazone. In a first experiment the susceptibility of two soybean varieties, V-TOP RR and BRS 284, was verified at increasing doses of sulfentrazone applied in pre-emergence. After verifying the reduction of plant height, root length, shoot and root dry mass of the V-TOP RR variety, it was defined as a sensitive pattern while BRS 284 was defined as a tolerant pattern. In the second experiment the same varieties were used, plus a third variety, NA 5909 RG. At 21 days after application, the xylem sap was extracted through a pressure chamber and the sulfentrazone concentration was determined by liquid chromatography coupled to the mass spectrometry. Plants of the sensitive variety, with smaller size and smaller dry mass presented the highest levels of sulfentrazone in the sap, with 160.36% more than the tolerant variety. It was concluded that methodology of herbicide quantification in the sap may serve as a test in the discrimination of the varieties, and in this way three levels of sensitivity to sulfentrazone were classified, being V-TOP RR sensitive, NA 5909 intermediate RG and BRS 284 tolerant.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill. PROTOX inhibitor. Aryl-triazolinone. Absorption.

INTRODUÇÃO

Após a liberação no Brasil da soja transgênica resistente ao glyphosate em 2005, houve aumento do uso deste herbicida como solução única de manejo no controle de plantas daninhas. Apesar de que no passado acreditava-se que a seleção de plantas daninhas resistentes ao glyphosate seria um evento improvável, o uso intensivo tem resultado na seleção de biótipos resistentes e vem comprometendo a eficácia deste herbicida (Shaner et al., 2012). Para prevenção e manejo da resistência de plantas daninhas, é desejável implementar práticas agrícolas que visem diminuir a pressão de seleção (Boerboom, 1999; Beckie, 2011). Uma das recomendações é a alternância do mecanismo de ação dos herbicidas. Neste âmbito, os herbicidas aplicados em pré-emergência, que anteriormente ao advento da tecnologia RR eram bastante utilizados, ressurgem como ferramentas no controle de plantas daninhas resistentes (Osipe et al., 2014). Aplicações com herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) retornaram principalmente para controle de *Conyza* spp. (Adegas et al., 2017).

A enzima PROTOX age na oxidação de protoporfirinogênio IX à protoporfirina IX, que são precursores da clorofila e do heme. Com a inibição competitiva da enzima, o acúmulo de protoporfirinogênio dentro do cloroplasto leva à perda de seletividade da membrana desta organela, o que resulta na sua passagem para o citoplasma, onde ocorre uma oxidação não-enzimática, que resulta na produção de uma protoporfirina altamente fotodinâmica. Na presença de luz, esta gera oxigênio singlet altamente reativo, que induz à peroxidação de lipídeos e, por consequência, destrói membranas celulares (Dayan e Duke, 2010).

Um dos principais herbicidas deste mecanismo de ação, devido ao eficiente controle de plantas daninhas em pré-emergência e seletividade à cultura da soja, é o sulfentrazone. O sulfentrazone pertence ao grupo químico das aril-triazolinonas, é absorvido pela raiz e translocado pelo xilema através do fluxo transpiratório (Dayan e Duke, 2010). Após 24 h da aplicação, quase todo herbicida absorvido é translocado para a parte aérea e 90% do herbicida é transformado em metabólitos solúveis em água. A seletividade do herbicida ocorre pela metabolização, por meio da rápida degradação oxidativa do grupo metil no anel da triazolinona, seguida por conjugação (Dayan et al., 1997). Além disso, algumas plantas se protegem da ação de inibidores da PROTOX pela degradação rápida dos tetrapirroles da protoporfirina IX acumulada em compostos não-tóxicos (Dayan et al., 1999).

Diversos estudos demonstram que há diferença entre variedades de soja na sensibilidade ao sulfentrazone (Dayan et al., 1997; Swantek et al., 1998; Hulting et al., 2001; Taylor-Lovell et al., 2001; Belfry et al., 2016). Atualmente os produtores brasileiros tendem a

escolher variedades de soja precoces e super-precoces, de ciclo curto, para evitar a ferrugem asiática (Silva et al., 2011) e para poder semear o milho (Bezerra et al., 2017) ou o algodão safrinha logo após a safra da soja; entretanto suspeita-se que a precocidade das novas variedades dificulta a recuperação da planta em relação aos efeitos do herbicida (Fornazza et al., 2018). Além disso, combinações de herbicidas pré e pós-emergentes aplicados nestas variedades podem apresentar diferentes níveis de seletividade e diminuição na produtividade (Fornazza et al., 2018). Ressalta-se também que a preocupação com a semeadura da safrinha resulta na semeadura da soja o mais cedo possível, o que pode deixar a semente em contato com o herbicida pré-emergente ainda ativo e disponível no solo. A tolerância ao sulfentrazone entre as variedades de soja parece ser controlada por um único gene e é dominante sobre a susceptibilidade (Swanek et al., 1998).

A absorção e translocação de sulfentrazone e a inibição da enzima Protox não são responsáveis pela resposta diferencial de variedades de soja. A quantidade acumulada de ¹⁴C-sulfentrazone nas folhas foi similar entre variedades com sensibilidade diferencial (Dayan et al., 1997).

Apesar da tolerância a sulfentrazone ocorrer devido à rápida metabolização do herbicida em plantas cultivadas, estudos demonstram que tampouco a metabolização é responsável pela resposta diferencial entre variedades, pois apesar de pequena diferença de metabolização ser observada três horas após o tratamento (Dayan et al., 1997), a variedade sensível e a tolerante metabolizaram o herbicida em intensidade semelhante em 24 horas após a exposição (Dayan et al., 1997; Li et al., 2000). Nas sementes, menos de 30% do sulfentrazone absorvido foi recuperado como sulfentrazone original (Li et al., 2000) e nas plantas, menos que 5% de sulfentrazone original encontrava-se nas folhas (Dayan et al., 1997). Porém, o potencial inibitório combinado dos metabólitos de sulfentrazone (3-hidroxi metil, 3-dimetil e 3-carboxilato) pode resultar em uma resposta fitotóxica transitória responsável pelo dano observado em folhas de soja (Dayan et al., 1998).

Uma outra possível causa da tolerância ao sulfentrazone pode estar relacionada à capacidade de metabolizar o estresse oxidativo, por meio de compostos antioxidantes, como vitaminas C e E e sistemas enzimáticos que eliminam radicais de oxigênio (Finck e Kunert, 1985; Komives e Gullner, 1994; Matsumoto et al., 1994). Na cultura do eucalipto observa-se que a absorção radicular pode ser uma das razões da variabilidade entre clones, uma vez que plantas com maiores reduções de massa seca de parte aérea apresentaram maiores concentrações de sulfentrazone na seiva (Carbonari et al., 2012) com efeito de fitointoxicação

mais notório em solos arenosos (Carbonari et al., 2016). A mesma diferença de absorção foi observada na cultura da cana-de-açúcar, na qual maior consumo de água e maiores teores de herbicida na seiva do xilema apresentam relação direta com menores restrições à absorção (Araldi et al., 2011).

Uma ferramenta que diferencie variedades sensíveis e tolerantes ao sulfentrazone seria de interesse aos técnicos, agricultores e aos melhoristas de planta. Um adequado posicionamento do produto é necessário para evitar perdas de produtividade, além de auxiliar no melhoramento de plantas, na identificação de fontes de susceptibilidade e tolerância e possibilitar uma triagem entre as variedades e entre os cruzamentos F₁'s, F₂'s e subsequentes. Anteriormente ao início do cultivo de soja resistente ao glyphosate, algumas variedades mais sensíveis e mais tolerantes eram conhecidas (Barros et al., 2005), e no processo do melhoramento, utilizava-se o sulfentrazone, o que resultava em uma seleção natural de variedades mais tolerantes. Entretanto, atualmente estas variedades não estão mais disponíveis no mercado. Além disso, as variedades de soja atualmente disponíveis são muito diferentes das variedades de alguns anos atrás, com ciclo mais curto, de menos de 120 dias, hábito de crescimento ereto ou semi-ereto, além da inserção de genes de resistência a herbicidas e insetos (Bezerra et al., 2017). Portanto, as novas variedades precisam ser avaliadas quanto à sensibilidade aos herbicidas.

A hipótese deste trabalho é que existem diferenças entre variedades de soja suscetíveis e tolerantes ao sulfentrazone, que podem ser detectadas por meio de um teste. O objetivo do trabalho é desenvolver um protocolo para identificação de variedades de soja sensíveis ao sulfentrazone.

MATERIAL E MÉTODOS

Em uma primeira etapa, para verificação da susceptibilidade ao sulfentrazone, duas variedades de soja foram avaliadas, V-TOP RR e BRS 284 que foram submetidas a testes prévios em campo³ e apresentaram-se sensível e tolerante ao herbicida, respectivamente.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Núcleo de Estudos Avançados em Ciência das Plantas Daninhas (NAPD) da Universidade Estadual de Maringá, em agosto de 2016. V-TOP RR apresenta hábito de crescimento indeterminado e grupo de maturação 5.9, o que significa ser super-precoce na macrorregião 2, região edafoclimática 201. Em contrapartida,

³ Experimentos realizados pelo engenheiro agrônomo M.Sc. Luís Henrique Penckowski e equipe na Fundação ABC.

a variedade BRS 284 é de hábito de crescimento indeterminado e grupo de maturação 6.3, portanto, de ciclo precoce na macrorregião e região citada anteriormente, sendo uma variedade convencional.

As variedades foram semeadas em vasos plásticos de 5 dm³. O solo utilizado apresentou as seguintes características químicas e físicas: 1,2% de M.O.; pH_{H2O} de 6,1; 1,6 cmol_c dm⁻³ de H⁺+Al³⁺; 1,5 cmol_c dm⁻³ de Ca²⁺; 0,6 cmol_c dm⁻³ de Mg²⁺; 0,35 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 24,0 mg dm⁻³ de P (método resina); 7,0 g dm⁻³ de C; 49,4 % de areia grossa; 20,2 % de areia fina; 6,9 % de silte e 23,5 % de argila e foi preparado livre de torrões.

Para verificar os efeitos do herbicida, quatro doses foram utilizadas: uma testemunha não-aplicada, um quarto da dose recomendada do herbicida (150 g ha⁻¹), metade da dose recomendada (300 g ha⁻¹) e, aproximadamente a dose recomendada (500 g ha⁻¹), uma vez que 600 g ha⁻¹ é a dose recomendada para solos argilosos e para solos leves e médios, recomendando-se doses menores (Rodrigues e Almeida, 2018). A aplicação foi realizada em pré-emergência, com o cuidado de semear, irrigar e aplicar. Para a aplicação do herbicida, foi utilizado pulverizador costal de pressão à base de CO₂, equipado com três pontas XR 110.02, espaçadas em 0,5 m entre si e posicionadas 0,5 m da superfície dos alvos, proporcionando uma taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹ de calda.

O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, em esquema fatorial 2x4, sendo duas variedades de soja (V-TOP RR e BRS 284) x quatro doses de sulfentrazone (0, 150, 300 e 500 g ha⁻¹). Foram avaliados altura de planta aos 21 e 30 dias após a aplicação (DAA), comprimento de raiz, massa seca de raiz e parte aérea aos 30 DAA. A medição de altura de planta e o comprimento de raiz foi realizado com uma régua milimetrada, a partir do nível do solo até o meristema apical. Ao final do experimento (30 DAA), as partes aérea e radicular foram coletadas rente ao solo, acondicionadas em saco de papel Kraft e colocadas em estufa de circulação de ar forçada a 60°C até obter massa constante para as variáveis massa seca de raiz e parte aérea.

Constatada a diferença entre as variedades, uma segunda etapa do experimento foi instalado em outubro de 2017, a fim de quantificar a absorção radicular do sulfentrazone. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação em Maringá – PR e as análises de laboratório foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (Nupam) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em Botucatu – SP.

Além das duas variedades previamente avaliadas, uma terceira variedade foi acrescentada ao estudo, a NA 5909 RG, para aumentar o alcance de variedades estudadas, a qual também já havia sido avaliada em testes prévios em campo⁴ e considerada sensível. Esta variedade apresenta hábito de crescimento indeterminado e grupo de maturação 6.2, portanto ciclo precoce a semiprecoce na macrorregião e região supracitada.

A instalação do experimento foi conduzida como no primeiro experimento, em relação ao solo, vasos e à aplicação em pré-emergência. Para a aplicação, foi utilizada somente a dose de 300 g ha⁻¹. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três variedades de soja (V-TOP RR, BRS 284 e NA 5909 RG) e seis repetições.

Quando as plantas estavam no estágio fisiológico entre V2 e V3, primeira e segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida, respectivamente, aos 21 DAA, os vasos foram transportados para Botucatu, onde foi realizada a extração e análise da seiva. As plantas foram cortadas ao nível do solo e a parte aérea foi colocada na câmara da bomba de Scholander, para extração da seiva do xilema (Scholander et al., 1965). A pressão foi aplicada até o momento que a primeira gota da seiva aparecesse na superfície do corte (Liang et al., 1996), a seiva do caule foi coletada com uma pipeta Pasteur e acondicionada em vials para posterior quantificação de sulfentrazone. A análise de sulfentrazone foi realizada de acordo com Carbonari et al. (2012), pelo método analítico com cromatógrafo líquido, Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) (Shimadzu, Prominence UFLC), equipado com duas bombas LC-20AD, um autoinjeter SIL-20AC, degazeificador DGU-20A₅, sistema de controle CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e um forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna) acoplado a um espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) (AppliedBiosystems). O tempo total de corrida foi de 10 minutos, e o tempo de retenção do sulfentrazone, de 5,24 minutos. As condições cromatográficas na quantificação do teor de sulfentrazone estão descritas na Tabela 1. A massa molecular e os fragmentos gerados de sulfentrazone foram de 386,950 (110,20; 146,10; 273,10). Os dados são expressos em ng mL⁻¹ de seiva.

⁴ Experimentos realizados pelo engenheiro agrônomo M.Sc. Luís Henrique Penckowski e equipe na Fundação ABC.

Tabela 1. Condições cromatográficas para quantificação de sulfentrazone.

Coluna analítica	Synergi 2.5 μ Hydro-RP 100Å, (50 x 4,6 mm)
Fase móvel	Fase A (FA) = Água com 0,5% ácido acético Fase B (FB) = Metanol com 0,5% ácido acético
Gradiente	0 – 1 minuto = 60% FA e 40% FB 1 – 4 minutos = 60% FA e 40% FB 4 – 6 minutos = 5% FA e 95% FB 6-8 minutos = 5% FA e 95% FB 7,5-10 minutos = 60% FA e 40% FB
Fluxo	0,4 mL min ⁻¹

Os dados foram submetidos à análise de variância após a verificação da homogeneidade de variância pela análise gráfica dos resíduos. A análise de regressão foi utilizada para as doses avaliadas em casa de vegetação. As comparações entre as médias de sulfentrazone na seiva foram realizadas por meio do teste t (LSD), a 10% de probabilidade, entre as variedades. A análise estatística foi computada utilizando-se o PROC GLM e PROC REG SAS (versão 9.4; SAS Institute, Inc. Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre variedades de soja e doses de sulfentrazone foi significativa para todas as variáveis-resposta analisadas. Foi ajustado um modelo linear para os dados da variedade V-TOP RR nas variáveis altura de planta aos 21 e 30 DAA, comprimento de raiz, massa seca de parte aérea aos 30 DAA e para a variável massa seca de raiz foi ajustado um modelo polinomial quadrático (Figura 1).

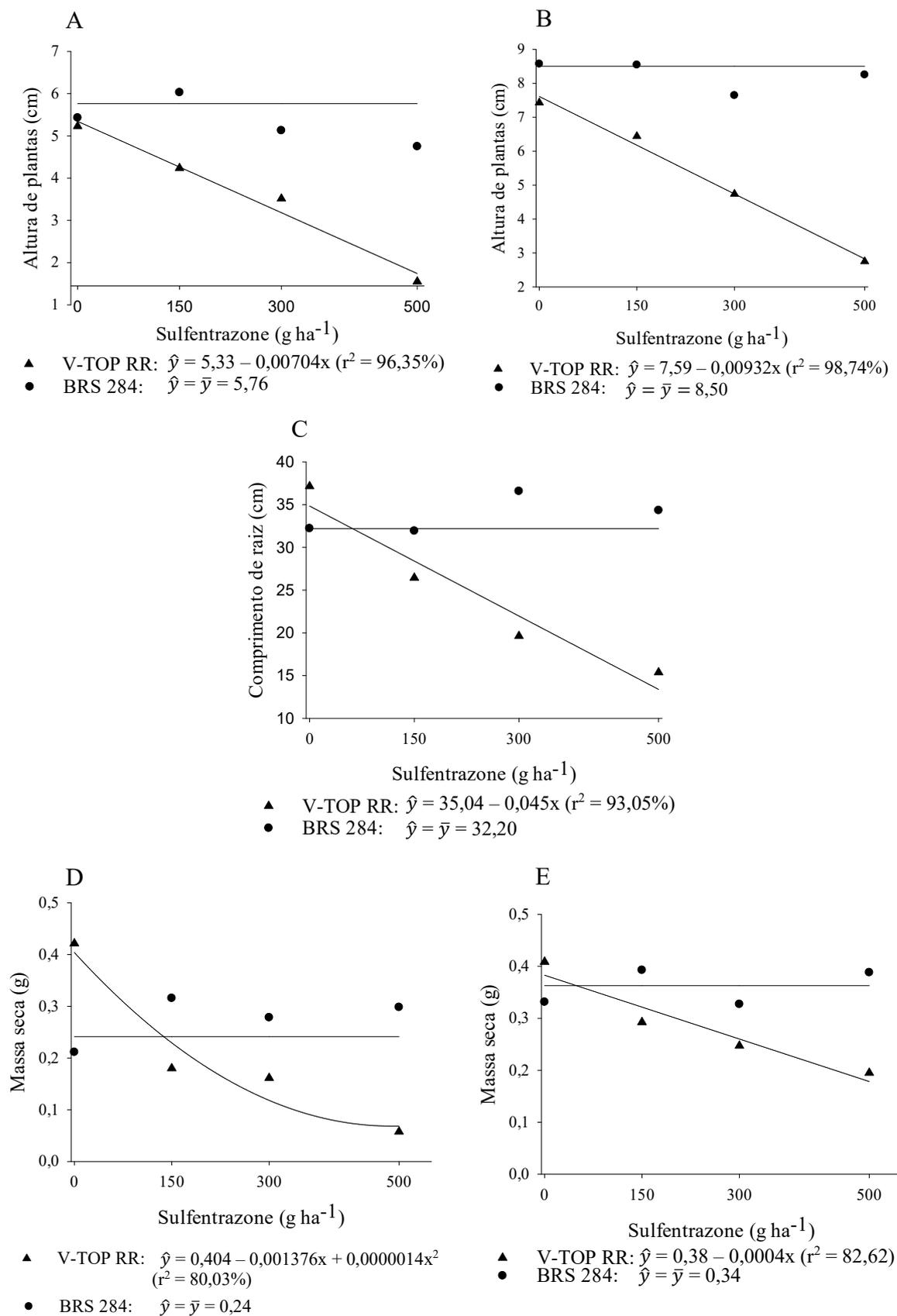


Figura 1. Altura de planta aos 21 dias após a aplicação (A), aos 30 dias após a aplicação (B), comprimento de raiz (C), massa seca de raiz (D) e massa seca de parte aérea (E) em duas variedades de soja, após a aplicação de doses crescentes de sulfentrazone.

Os resultados indicam que ocorreu redução na altura de planta aos 21 e 30 DAA, comprimento de raiz, massa seca de raiz e parte aérea à medida que doses mais altas foram utilizadas na variedade V-TOP RR. Ao contrário, as variáveis-resposta na variedade BRS 284 apresentavam efeitos não significativos, ou seja, as mesmas variáveis respostas analisadas não foram afetadas pelo aumento de dose de sulfentrazone. Na comparação das duas variedades, uma das características que mais se destacou foi a diminuição do porte da planta. Na dose de 300 g ha⁻¹ de sulfentrazone, houve redução de 44,1 e 43,6% na altura da variedade sensível em comparação à variedade tolerante aos 21 e 30 DAA, respectivamente. A redução de raiz da variedade sensível, em comparação à tolerante, foi da ordem de 34,55%. O menor comprimento de parte aérea e de raiz também se apresentaram como características relevantes em outros estudos (Dayan et al., 1997; Li et al., 1999). Li et al. (1999) sugerem, inclusive, que a dimensão da raiz pode ser utilizada para prever o efeito do herbicida no rendimento de variedades de soja. Os menores acúmulos de massa seca da parte aérea observados em variedade sensível são característicos também em clones de eucalipto com maior sensibilidade ao sulfentrazone (Carbonari et al., 2012). O ponto de mínimo de massa seca de raiz é na dose de 491,43 g ha⁻¹ de herbicida. Portanto, as características avaliadas auxiliam na determinação da sensibilidade de variedades de soja ao sulfentrazone.

Aos 21 DAA, ou seja, no estágio V1, com folhas unifolioladas completamente desenvolvidas, observou-se na variedade V-TOP RR necrose no colo da planta em nível do solo, com necrose das margens dos cotilédones, clorose e bronzeamento das folhas do primeiro par unifoliolado, na dose de 150 g ha⁻¹. Os mesmos sintomas, porém, mais acentuados, foram também observados na dose de 300 g ha⁻¹. Na dose de 500 g ha⁻¹ houve supressão da emergência, no qual apenas duas plantas em um dos vasos emergiram. Ao contrário, a variedade BRS 284 apresentou crescimento normal, sem sintomas aparentes. Estes sintomas também são descritos em trabalhos de Dayan et al. (1997), Taylor-Lovell et al. (2001) e Hulting et al. (2001).

Dessa forma, conclui-se que a variedade V-TOP RR poderia ser utilizada como um padrão sensível ao sulfentrazone ao passo que a BRS 284 poderia ser utilizada como um padrão tolerante para o experimento seguinte, no qual utilizou-se a dose de 300 g ha⁻¹ para exibir as diferenças de tolerância ao sulfentrazone aplicado em pré-emergência.

No segundo experimento, foram obtidos os teores de sulfentrazone na seiva extraída do xilema das variedades de soja (Figura 2). Observa-se que a variedade padrão sensível V-TOP RR apresentou a maior concentração de sulfentrazone na seiva entre as variedades

analisadas, apesar do menor tamanho, como observado com o menor comprimento e massa seca de parte aérea e de raiz. As concentrações de sulfentrazone na seiva encontravam-se na ordem de 1,23; 0,83 e 0,472 ng mL⁻¹ de seiva, respectivamente para as variedades V-TOP RR, NA 5909 RG e BRS 284. Portanto, a variedade sensível apresentou concentração 1,6 vezes mais alta do que a variedade tolerante e a variedade NA 5909 RG, que apresentou 0,73 vezes a quantidade da variedade tolerante. Em trabalho de Carbonari et al. (2012), estabeleceu-se que esta metodologia também possibilitou discriminar tolerância de clones de eucalipto. Assim, conclui-se que a análise do teor de sulfentrazone na seiva do xilema pode ser um indicador eficiente que possibilita a separação da sensibilidade de variedades de soja ao herbicida. Classificaram-se as três variedades de soja em níveis de tolerância ao sulfentrazone, sendo a V-TOP RR sensível, a NA 5909 RG intermediária e BRS 284 tolerante.

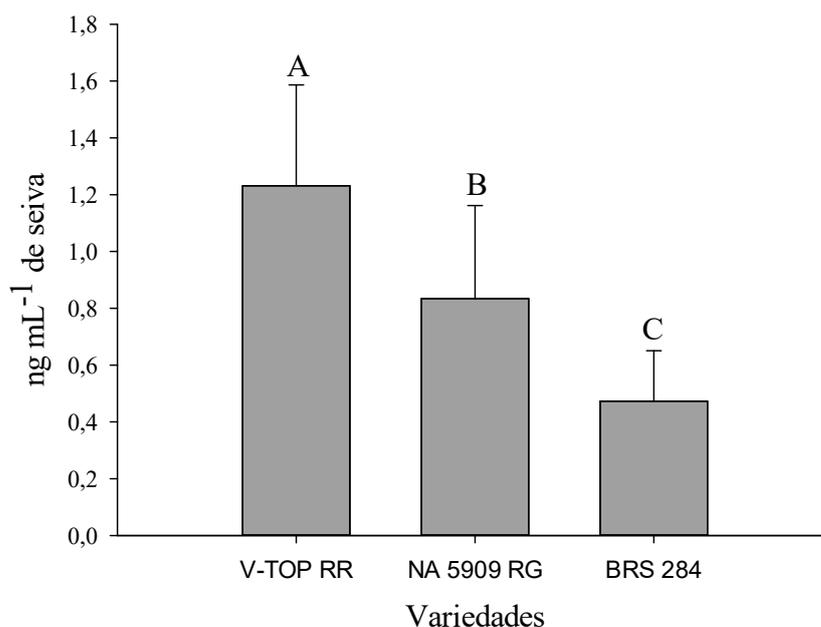


Figura 2. Concentração de sulfentrazone na seiva do xilema de plantas de soja em resposta a diferentes variedades de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de t, a 10% de probabilidade. As barras representam os desvios padrão.

O trabalho de Araldi et al. (2011) corrobora com os resultados obtidos. A transpiração das plantas exige um fluxo contínuo de água das raízes à parte aérea, fundamental para o transporte do herbicida das raízes às folhas. A cultivar de cana-de-açúcar tolerante a herbicidas inibidores do fotossistema II apresentou menores teores de herbicidas na seiva, menor consumo

de água pela planta, indicando menor absorção dos compostos. A cultivar sensível apresentou, dessa forma, menores restrições à absorção. A tolerância a herbicidas devido às diferenças de absorção em tratamentos de pré-emergência pode estar associada a diferenças em estruturas anatômicas ou a fatores fisiológicos no sistema radicular (Rojano-Delgado et al., 2014).

Em experimentos posteriores, deve-se procurar avaliar um número maior de variedades de soja para se estabelecer valores limítrofes entre variedades sensíveis e tolerantes ao sulfentrazone. Para evitar o efeito de diferença de concentração do herbicida no solo ocasionado pelos diferentes tipos de solo e, conseqüentemente, diferenças de teores de sulfentrazone absorvido, sugere-se que estes experimentos posteriores sejam realizados de forma que o solo não possa interferir nos resultados. Estes testes poderiam ser realizados em papel Germitest, em leito de areia ou com semeadura em solo e posterior transferência para solução contendo o herbicida, conforme Carbonari et al. (2012).

CONCLUSÕES

A variedade V-TOP RR foi identificada como um padrão sensível ao sulfentrazone pela menor altura de planta, comprimento de raiz, massa seca da parte aérea e raiz em comparação à variedade BRS 284, identificada como padrão tolerante.

A metodologia de quantificação do herbicida na seiva pode atuar como indicativo na discriminação das variedades, e desta forma, classificaram-se três níveis de sensibilidade ao sulfentrazone, sendo V-TOP RR sensível, NA 5909 RG intermediária e BRS 284 tolerante.

REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. S.; VARGAS, L.; GAZZIERO, D. L. P.; KARAM, D. **Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2017. (Circular Técnica, 132).
- ARALDI, R.; VELINI, E. D.; GIROTTO, M.; CARBONARI, C. A.; SAMPAIO, T. F.; TRINDADE, M. L. B. Relação entre o consumo de água e a absorção de herbicidas em plantas daninhas e cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1045-1051, 2011.
- BARROS, A. C.; MONTEIRO, P. M. F. O.; FURTADO, X. C.; NUNES JÚNIOR, J.; GUERZONI, R. A. Tolerância de cultivares de soja aos herbicidas imazaquin, diclosulam e sulfentrazone, aplicados em solo de textura arenosa. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005.
- BECKIE, H. J. Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. **Pest Management Science**, v. 67, n. 9, p. 1037-1048, 2011.
- BELFRY, K. D.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Identity-Preserved Soybean Tolerance to Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. **Weed Technology**, v. 30, n. 1, p. 137-147, 2016.
- BEZERRA, A. R. G.; SEDIYAMA, T.; SILVA, F. L.; BORÉM, A.; SILVA, A. F.; SILVA, F. C. S. Agronomical aspects of the development of cultivars. In.: SILVA, F. L.; BORÉM, A.; SEDIYAMA, T.; LUDKE, W. H. (eds.). **Soybean Breeding**. Gewerbestrasse: Springer, 2017. p. 395-411.
- BOERBOOM, C. M. Nonchemical options for delaying weed resistance to herbicides in Midwest cropping systems. **Weed Technology**, v. 13, n. 3 p. 636-642, 1999.
- CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D.; GOMES, G. L. G. C.; TAKAHASHI, E. N.; ARALDI, R. Seletividade e absorção radicular do sulfentrazone em clones de eucalipto. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 147-153, 2012.

CARBONARI, C. A.; MIRANDA, L. G.; GOMES, G. L. M. C.; PICOLI JUNIOR, G. J.; MATOS, A. K. A.; VELINI, E. D. Differential tolerance of eucalyptus clones to sulfentrazone applied in different soil textures. **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 109, p. 9-18, 2016.

DAYAN, F. E.; ARMSTRONG, B. M.; WEETE, J. D. Inhibitory activity of sulfentrazone and its metabolic derivatives on soybean (*Glycine max*) protoporphyrinogen oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 2024-2029, 1998.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Protoporphyrinogen oxidase – inhibiting herbicides. In.: KRIEGER, R.; DOULL, J.; HODGSON, E.; MAIBACH, H.; REITER, L.; RITTER, L.; ROSS, J.; SLIKKER, W. J.; VAN HEMMEN, J. (eds.). **Haye's Handbook of Pesticide Toxicology**. 3 ed. Vol. 2. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2010. p. 1733-1751.

DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O.; JACOBS, N. J. Thiol-dependent degradation of protoporphyrin IX by plant peroxidases. **FEBS letters**, v. 444, n. 2, p. 227-230, 1999.

DAYAN, F. E.; WEETE, J. D.; DUKE, S. O.; HANCOCK, H. G. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. **Weed Science**, v. 45, n. 5, p. 634-641, 1997.

FINCK, B. E.; KUNERT, K. J. Vitamins C and E: an antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 574-577, 1985.

FORNAZZA, F. G. F.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, F. G.; OLIVEIRA Jr., R. S.; SILVA, G. D.; RIOS, F. A. Selectivity of pre-and post-emergence herbicides to very-early maturing soybean cultivars. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 4, p. 649-658, 2018.

HULTING, A. G.; WAX, L. M.; NELSON, R. L.; SIMMONS, F. W. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar tolerance to sulfentrazone. **Crop Protection**, v. 20, p. 679-683, 2001.

KOMIVES, T.; GULLNER, G. Mechanisms of plant tolerance to photodynamic herbicides. In.: DUKE, S. O.; REBEIZ, C. A. (eds) **Porphyric Pesticides: Chemistry, Toxicology, and Pharmaceutical Applications**. Washington: American Chemical Society Symposium Series 559, 1994. p. 177-190.

LI, Z.; WALKER, R. H.; WEHTJE, G. R.; HANCOCK, H. G. Use of seedling growth parameters to classify soybean (*Glycine max*) cultivar sensitivity to sulfentrazone. **Weed Technology**, v. 13, n. 3, p. 530-535, 1999.

LI, Z.; WEHTJE, G. R.; WALKER, R. H. Physiological basis for the differential tolerance of *Glycine max* to sulfentrazone during seed germination. **Weed Science**, v. 48, n. 3, p.281-285, 2000.

LIANG, J.; ZHANG, J.; WONG, M. H. Stomatal conductance in relation to xylem sap ABA concentration in two tropical trees: *Acacia confuse* and *Litsea glutinosa*. **Plant Cell & Environment**, v. 19, n. 1, p. 93-100, 1996.

MATSUMOTO, H.; LEE, J. J.; ISHIZUKA, K. Variation in crop response to protoporphyrinogen oxidase inhibitors. In.: DUKE, S. O.; REBEIZ, C. A. (eds.) **Porphyric Pesticides: Chemistry, Toxicology, and Pharmaceutical Applications**. Washington: American Chemical Society Symposium Series 559, 1994. p. 120-132.

OSIPE, J. B.; OLIVEIRA Jr., R. S., CONSTANTIN, J.; BIFFE, D. F.; RIOS, F.A.; FRANCHINI, L. H. M.; GHENO, E. A.; RAIMONDI, M. A. Seletividade de aplicações combinadas de herbicidas em pré e pós-emergência para a soja tolerante ao glyphosate. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 623-631, 2014

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 7 ed. Londrina: Edição dos autores, 2018. 764 p.

ROJANO-DELGADO, A. M.; MENÉNDEZ, J.; PRADO, R. Absorption and penetration of herbicides viewed in metabolism studies: case of glufosinate and imazamox in wheat. In. MYUNG, K.; SATCHIVI, N. M.; KINGSTON, C. K. **ACS Symposium Series - Retention, Uptake, and Translocation of Agrochemicals in Plants**, Vol. 1171. Washington: American Chemical Society, 2014. p. 159-165.

SCHOLANDER, P. F.; BRADSTREET, E. D.; HEMMINGSEN, E. A.; HAMMEL, H. T. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, n. 3, p. 339-346, 1965.

SHANER, D. L.; LINDENMEYER, R. B.; OSTLIE, M. H. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 3-9, 2012.

SILVA, J. V. C.; JULIATTI, F. C.; SILVA, J. R. V.; BARROS, F. C. Soybean cultivar performance in the presence of soybean Asian rust, in relation to chemical control programs. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 3, p. 409-418, 2011.

SWANTEK, J. M.; SNELLER, C. H.; OLIVER, L. R. Evaluation of soybean injury from sulfentrazone and inheritance of tolerance. **Weed Science**, v. 46, n. 3, p. 271-277, 1998.

TAYLOR-LOVELL, S.; WAX, L. M.; NELSON, R. Phytotoxic response and yield of soybean (*Glycine max*) varieties treated with sulfentrazone or flumioxazin. **Weed Technology**, v. 15, p. 95-102, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que para o herbicida chlorimuron-ethyl aplicado em pós-emergência, a variedade MSOY 6410 IPRO é um padrão sensível, enquanto que AS 3570 IPRO é um padrão tolerante. No estágio V4 da planta, os aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina apresentaram-se naturalmente superiores na variedade tolerante, em comparação à variedade sensível, sem aplicação do herbicida. Quando o herbicida é aplicado às plantas, a elevação do teor de ácido 2-aminobutírico na variedade sensível é significativa, enquanto para a variedade tolerante não há alteração na quantidade deste composto.

A variedade V-TOP RR apresentou menores alturas de planta, comprimentos de raiz, massa seca de parte aérea e raiz proporcionalmente ao aumento das doses de sulfentrazone aplicados em pré-emergência, ao passo que a BRS 284 teve as características mantidas ao longo das doses testadas. Apesar da pequena dimensão das plantas sensíveis, a variedade V-TOP RR apresentou os maiores teores de sulfentrazone na seiva do xilema, enquanto que BRS 284 apresentou os menores teores. A metodologia de quantificação do herbicida na seiva pode atuar como indicativo na discriminação das variedades, e classificou três níveis de sensibilidade ao sulfentrazone, sendo a V-TOP RR sensível, NA 5909 RG intermediária e BRS 284 tolerante.

Assim, com o presente trabalho foi possível identificar testes que discriminam as variedades de soja quanto à tolerância diferencial aos herbicidas chlorimuron-ethyl e sulfentrazone. Para o teste da tolerância das variedades de soja ao diclosulam ainda é necessário a adequação de método, como avaliar em estádios mais novos de desenvolvimento da planta.

APÊNDICE A. Resumos de Análises de Variância e Cromatogramas dos
Experimentos do Capítulo 1

Tabela 1A. Análise de variância para as variáveis: notas de fitointoxicação (Fito) aos 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) para variedades, doses e a interação entre os dois fatores na primeira etapa do experimento A. Maringá – PR, 2018.

F.V.	G.L.	p-valor	
		Fito 7 DAA	Fito 14 DAA
Variedades (V)	1	< 0,0001	< 0,0001
Doses (D)	3	< 0,0001	< 0,0001
V x D	3	< 0,0001	< 0,0001
Desdobramento variedades/doses			
Variedades/0 g ha ⁻¹	1	1,00	1,00
Variedades/20 g ha ⁻¹	1	< 0,0001	< 0,0001
Variedades/40 g ha ⁻¹	1	< 0,0001	< 0,0001
Variedades/80 g ha ⁻¹	1	< 0,0001	< 0,0001
Desdobramento doses/variedades			
Doses/MSOY 6410 IPRO	3	< 0,0001	< 0,0001
Doses/AS 3570 IPRO	3	1,00	1,00
Erro	40		
Total	47		
C.V. (%)	-	19,56	20,08

F.V.: Fonte de variação; G.L.: graus de liberdade; C.V.: coeficiente de variação.

Tabela 2A. Análise de variância para a variável teor interno de chlorimuron-ethyl (chlor) para variedades de soja, momentos de coleta da planta e a interação entre os dois fatores na segunda etapa do experimento A. Maringá – PR, 2018.

F.V.	G.L.	p-valor
		chlor
Variedades (V)	1	0,3017
Coleta (C)	2	<0,0001
V x C	2	0,8288
Erro	30	
Total	35	
C.V. (%)		36,82

F.V.: Fonte de variação; G.L.: graus de liberdade; C.V.: coeficiente de variação.

Tabela 3A. Análise de variância para as variáveis teor de chlorimuron-ethyl (chlor), teor de isoleucina e leucina [iso+leu], de valina e de ácido 2-aminobutírico (2-aba) para variedades de soja, momentos de coleta da planta e a interação entre os dois fatores na segunda etapa do experimento A. Maringá – PR, 2018.

F.V.	G.L.	p-valor		
		[iso+leu]	valina	2-aba
Variedades (V)	3	0,0009	<0,0001	<0,0001
Coleta (C)	2	0,001	<0,0001	0,167
V x C	6	0,044	0,082	0,013
Desdobramento variedades/coletas				
Variedades/1 DAA	3	0,2097	<0,0001	<0,0001
Variedades/2 DAA	3	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Variedades/7 DAA	3	0,4841	<0,0001	0,0048
Desdobramento coletas/variedades				
Coletas/MSOY 6410 IPRO testemunha	2	0,7290	0,2859	0,8162
Coletas/MSOY 6410 IPRO aplicado	2	0,3910	0,0020	0,8162
Coletas/AS 3570 IPRO testemunha	2	0,2621	<0,0001	0,5747
Coletas/AS 3570 IPRO aplicado	2	<0,0001	<0,0001	0,6514
Erro	60			
Total	71			
C.V. (%)		19,73	13,52	38,19

Tabela 4A. Análise de variância para as variáveis teor de diclosulam (diclo), de isoleucina e leucina [iso+leu], de valina e de ácido 2-aminobutírico (2-aba) para variedades de soja, momentos de coleta da planta e a interação entre os dois fatores no experimento B. Maringá – PR, 2018.

F.V.	G.L.	p-valor			
		diclo	[iso+leu]	valina	2-aba
Variedades (V)	7	0,179	<0,0001	0,259	<0,0001
Coleta (C)	1	0,404	<0,0001	<0,0001	<0,0001
V x C	7	0,727	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Desdobramento variedades/coletas					
Variedades/unifoliolado	7	---	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Variedades/1º trifólio	7	---	0,2919	0,0175	0,5155
Desdobramento coletas/variedades					
Coletas/BMX Vanguarda IPRO testemunha	1	---	0,0166	<0,0001	0,5888
Coletas/BMX Vanguarda IPRO aplicado	1	---	<0,0001	<0,0001	0,0017
Coletas/BMX Força RR testemunha	1	---	0,1302	<0,0001	0,0109
Coletas/BMX Força RR aplicado	1	---	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Coletas/BMX Potência RR testemunha	1	---	0,0504	<0,0001	0,4644
Coletas/BMX Potência RR aplicado	1	---	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Coletas/BMX Energia RR testemunha	1	---	<0,0001	<0,0001	0,1385
Coletas/BMX Energia RR aplicado	1	---	<0,0001	<0,0001	0,0400
Erro	80				
Total	95				
C.V. (%)	-		21,28	13,77	14,12

F.V.: Fonte de variação; G.L.: graus de liberdade; C.V.: coeficiente de variação.

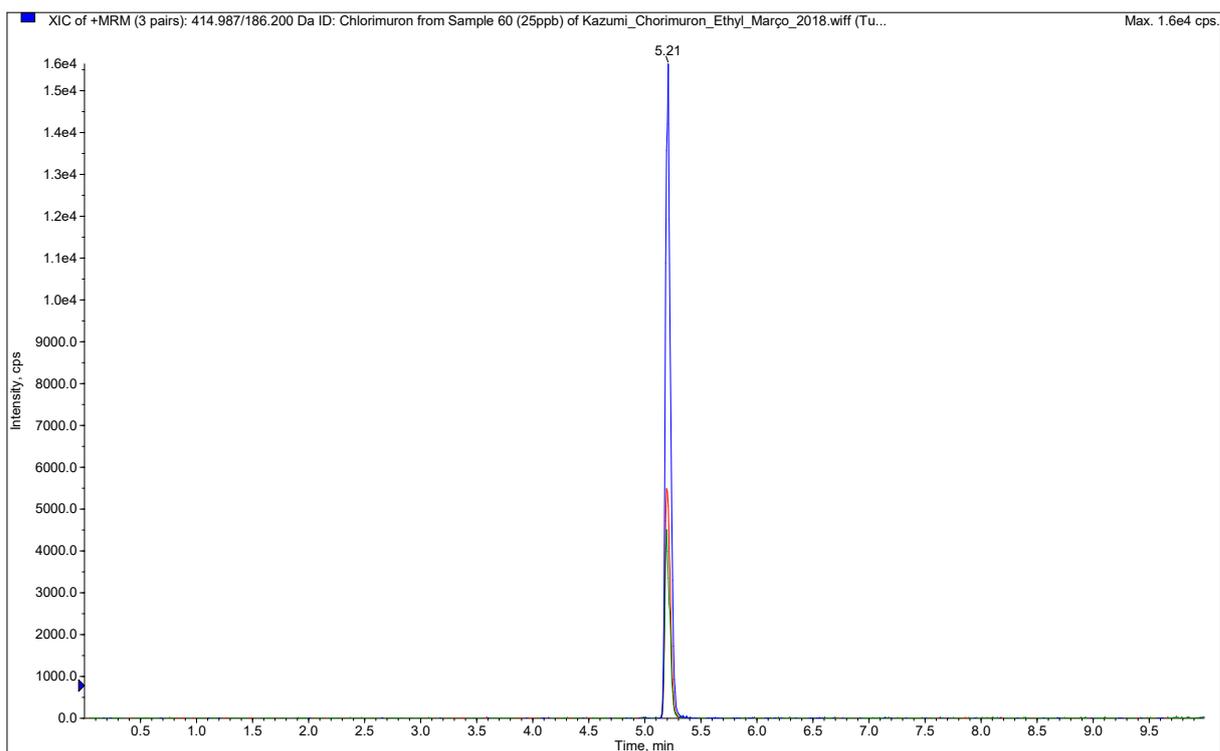


Figura 1A. Cromatograma de chlorimuron-ethyl e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL^{-1} .

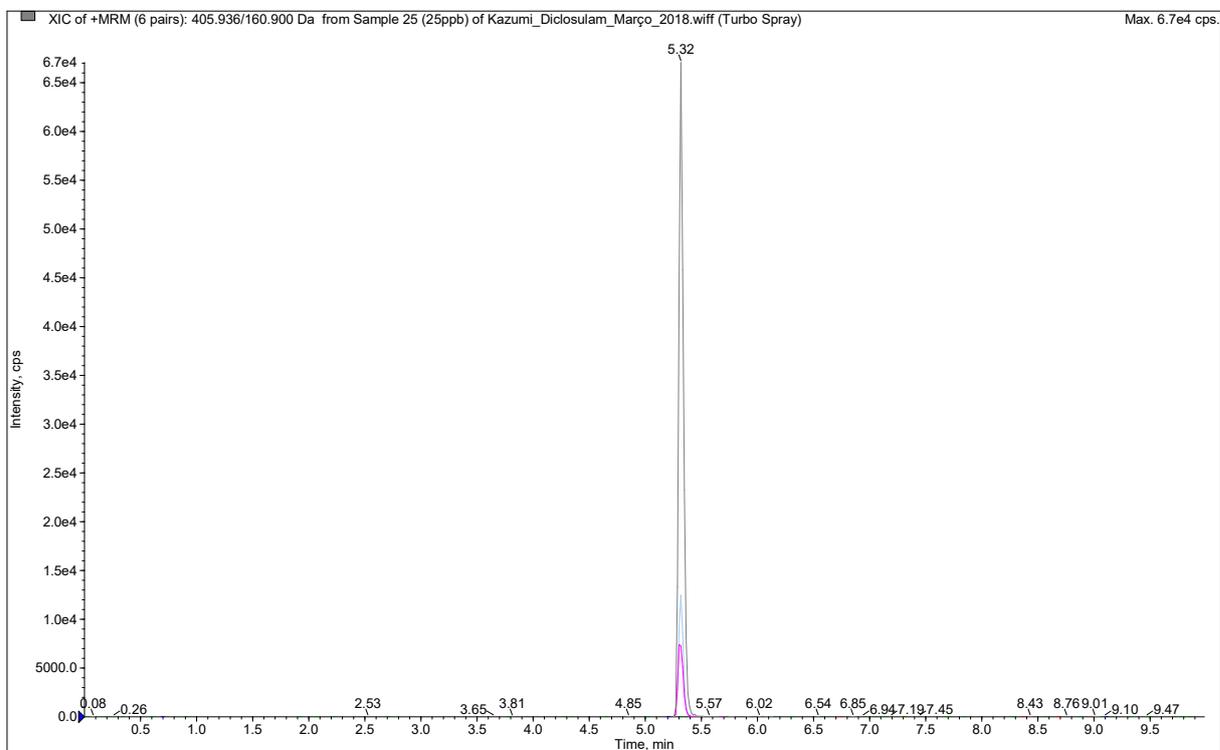


Figura 2A. Cromatograma de diclosulam e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL^{-1} .

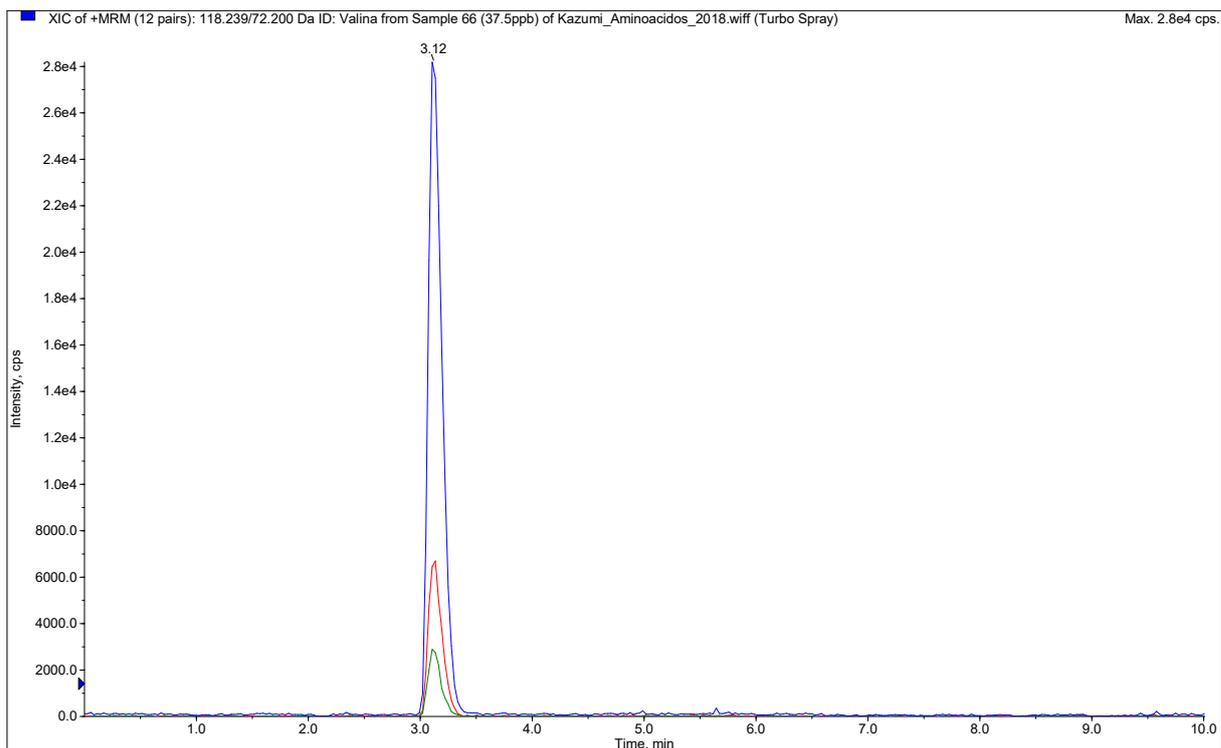


Figura 3A. Cromatograma de valina e os fragmentos gerados na concentração de 37,5 ng mL⁻¹.

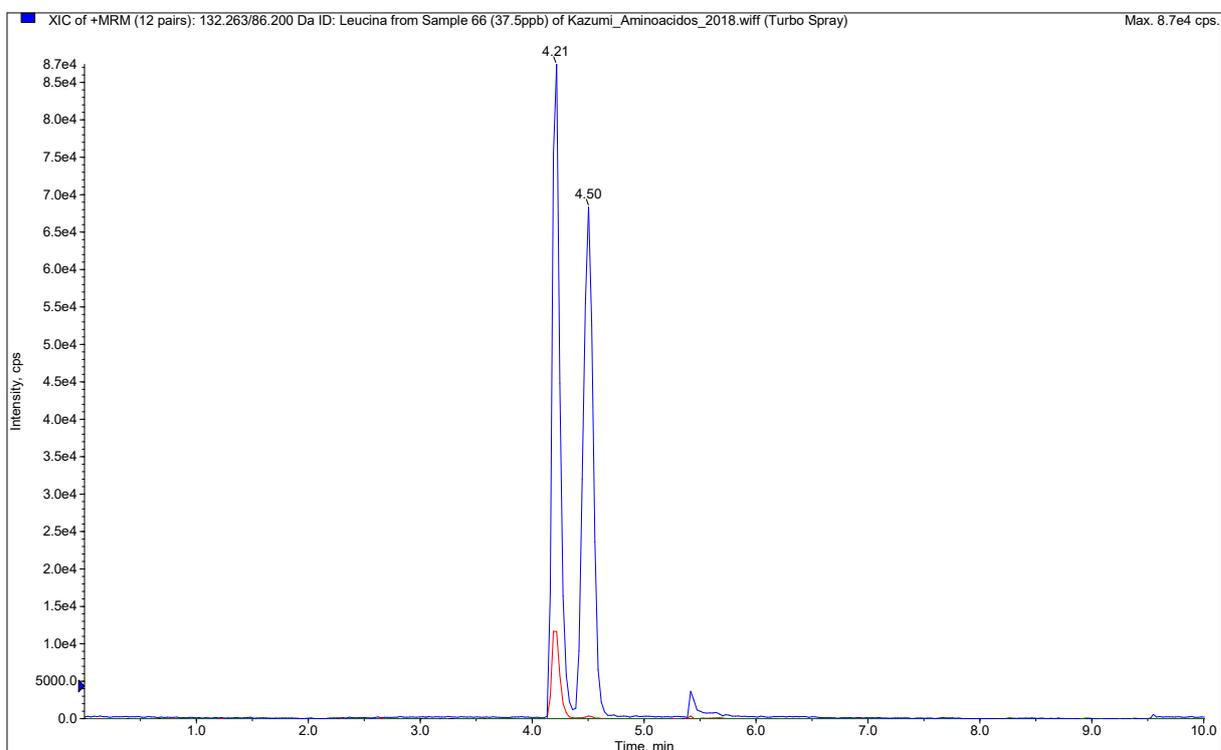


Figura 4A. Cromatograma de leucina e os fragmentos gerados na concentração de 37,5 ng mL⁻¹.

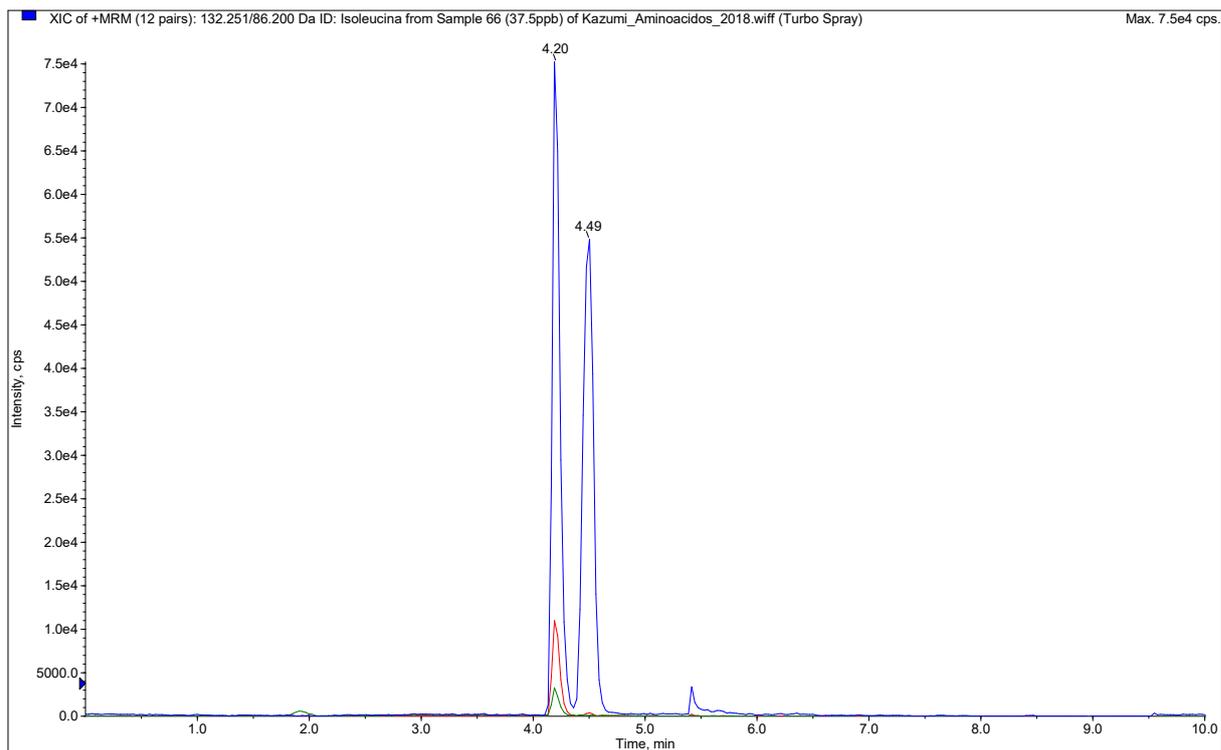


Figura 5A. Cromatograma de isoleucina e os fragmentos gerados na concentração de $37,5 \text{ ng mL}^{-1}$.

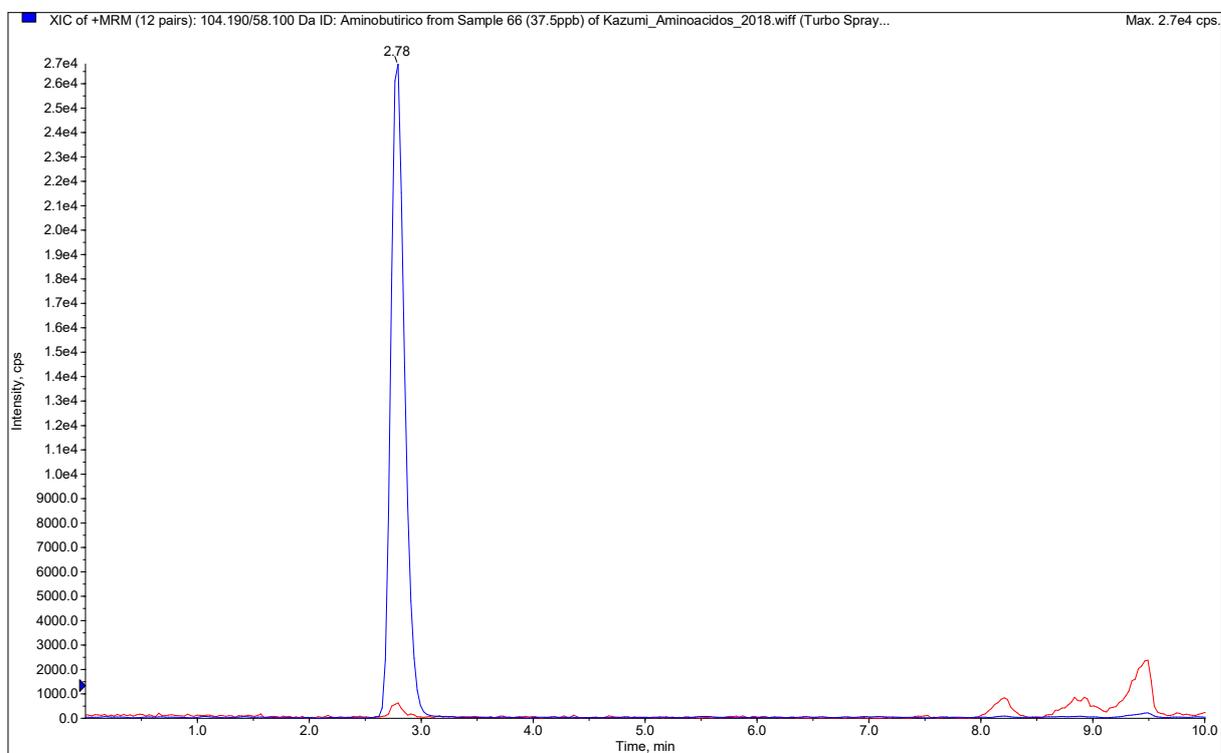


Figura 6A. Cromatograma de ácido 2-aminobutírico e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL^{-1} .

APÊNDICE B. Resumos de Análises de Variância, Cromatogramas e Fotos dos
Experimentos do Capítulo 2

Tabela 1B. Análise de variância para as variáveis altura de planta aos 21 (AP_21DAA), e aos 30 dias após a aplicação (AP_30DAA), comprimento de raiz (CR), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) em duas variedades de soja e doses de sulfentrazone.

F.V.	G.L.	p-valor				G.L.	p-valor MSR
		AP 21DAA	AP 30DAA	CR	MSPA		
Variedades (V)	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0181	1	0,0044
Doses (D)	3	0,0002	0,0007	0,0018	0,1558	3	0,0106
V x D	3	0,0199	0,0123	<0,0001	0,0281	3	<0,0001
Desdobramento variedades/doses							
Variedades/0	1	0,7509	0,1321	0,0882	0,1463	1	<0,0001
Variedades/150	1	0,0010	0,0042	0,0410	0,0510	1	0,0024
Variedades/300	1	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1320	1	0,0018
Variedades/500	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0026	1	<0,0001
Desdobramento doses/variedades							
Doses/ V-TOP RR	3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0106	3	<0,0001
Regressão linear	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0012	1	<0,0001
Regressão quadrática	---	---	---	---	---	1	<0,0001
Desvios da regressão	2	0,4068	0,7771	0,2309	0,5316	1	0,0760
Doses/ BRS 284	3	0,2383	0,6508	0,4482	0,5370	3	0,1380
Regressão linear	1	0,3461	0,5562	0,3024	0,6172	1	0,1292
Desvios da regressão	2	0,4182	0,6469	0,4310	0,3984	2	0,1598
Erro	54					54	
Total	63					63	
C.V. (%)		24,25	22,14	18,95	32,84		33,54

F.V.: Fonte de variação, G.L.: Graus de liberdade.

Tabela 2B. Análise de variância para a variável concentração de sulfentrazone na seiva do xilema de plantas de soja para variedades de soja, herbicida (com ou sem) e a interação entre os dois fatores. Maringá – PR, 2018.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{cal}	p-valor
Variedades	2	1,726	0,863	9,76	0,0019
Erro	15	1,327	0,088		
Total	17				
C.V. (%)	-	35,15			

F.V.: Fonte de variação; G.L.: graus de liberdade; S.Q.: soma de quadrados; Q.M.: quadrado médio; F_{cal}: F calculado; C.V.: coeficiente de variação.

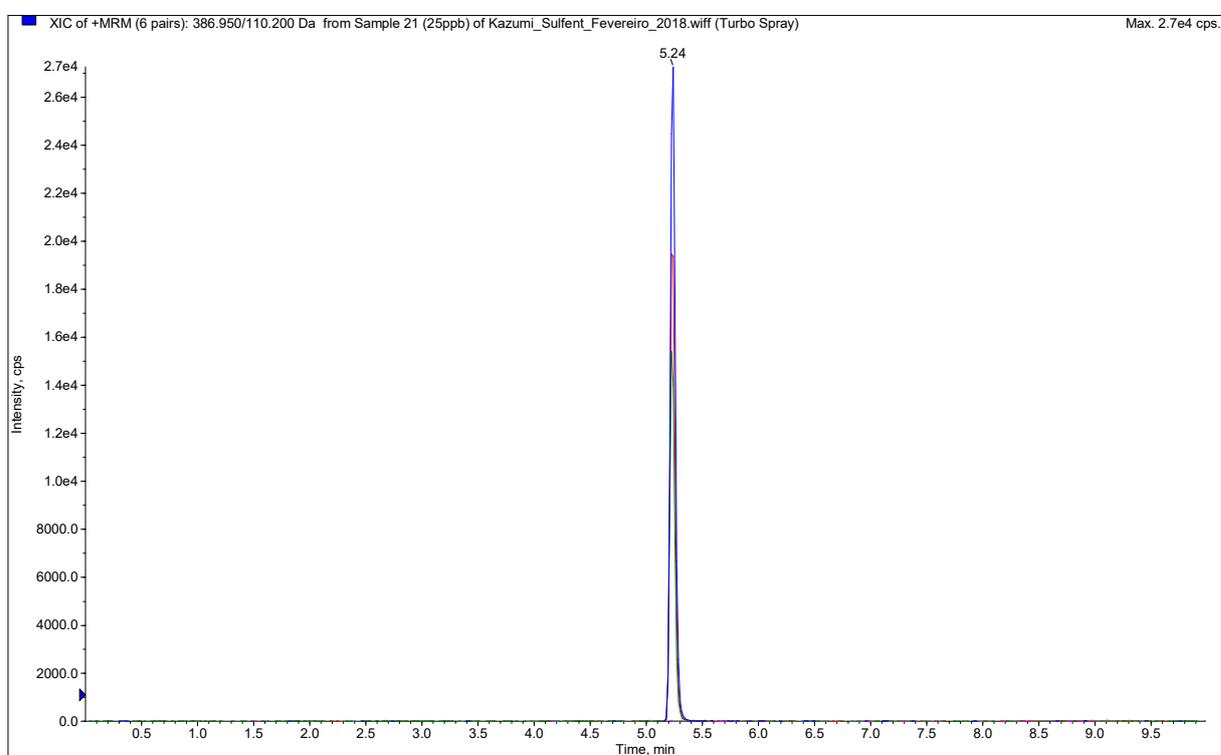


Figura 1B. Cromatograma de sulfentrazone e os fragmentos gerados na concentração de 25 ng mL⁻¹.

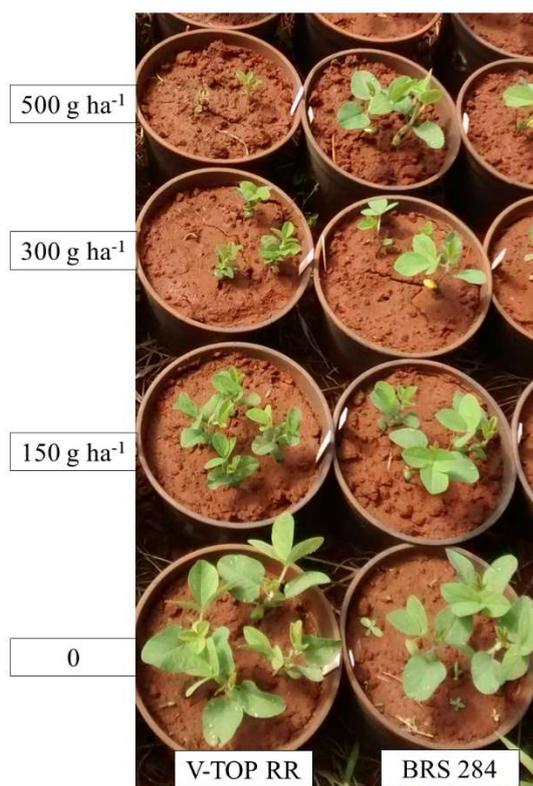


Figura 2B. Sintomas de fitointoxicação causadas por sulfentrazone em doses crescentes na variedade sensível, V-TOP RR e tolerante, BRS 284, aos 21 dias após a aplicação. Maringá-PR.

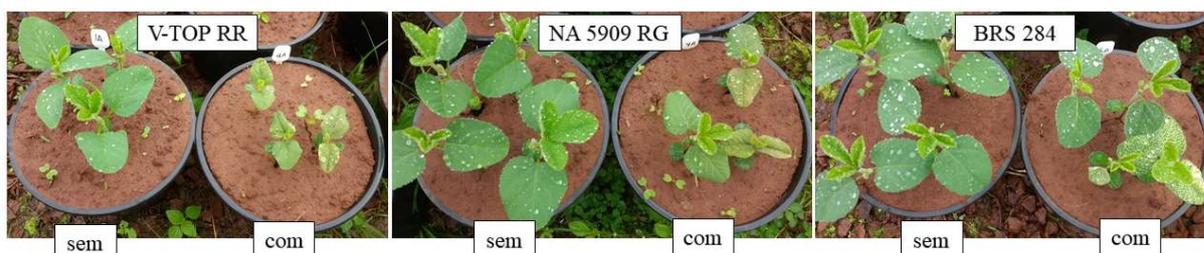


Figura 3B. Comparação da variável sensível, V-TOP RR, intermediária, NA 5909 RG e tolerante, BRS 284 com as respectivas plantas sem aplicação aos 21 dias após a aplicação. Maringá-PR.