Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*) ao herbicida glyphosate

Caio Augusto de Castro Grossi Brunharo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2014

Caio Augusto de Castro Grossi Brunharo
Engenheiro Agrônomo

Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*) ao herbicida glyphosate

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Brunharo, Caio Augusto de Castro Grossi
Resistência da planta daninha capim-branco (Chloris polydactyla) ao herbicida glyphosate / Caio Augusto de Castro Grossi Brunharo.- - Piracicaba, 2014.
153 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Dose-resposta 2. Curva de crescimento 3. Controle químico 4. Mecanismo de resistência I. Título

CDD 632.58
B895r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Margareth de Castro Ferro Brunharo e

Evaldil Carlos Brunharo,

pelo exemplo de vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- À gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por todo o crescimento pessoal que me proporcionou, tanto academicamente como pessoalmente;

- Ao Professor Pedro Jacob Christoffoleti, pela orientação, amizade e oportunidades concedidas desde minha graduação até os momentos atuais;

- À minha namorada, colega acadêmica durante a graduação, colega acadêmica durante o mestrado e futura colega acadêmica durante o doutorado, Engª Agrônoma Daniela Resende Carrijo, por todo o apoio nos experimentos, companheirismo e carinho;

- Ao Professor Dr. Scott Jay Nissen, pela amizade e oportunidades concedidas durante minha graduação e pós-graduação;

- Ao Professor Dr. Todd Gaines e MsC. Eric Patterson, pela amizade e apoio nos experimentos de biologia molecular;

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelas bolsas de graduação e mestrado concedidas;

- Ao amigo e Engenheiro Agrônomo MSc. Marcel Sereguin Cabral de Melo, pela amizade e ensinamentos ao longo de minha carreira como Matologista;

- Ao colega, amigo e Engenheiro Agrônomo MSc. Flávio Eduardo Botelhos Obara, pelos conselhos técnicos e conversas construtivas durante nossas horas no estágio;

- Aos Engenheiros Agrônomos Dr. Marcelo Nicolai, MSc. Ana Beatriz Campos de Almeida Prado, Marcelo Rodrigues Alves de Figueiredo, Lucas Elache Rosa, Ednaldo Alexandre Borgato e graduando Everton Servilho Barbosa, que tiveram papel indispensável tanto na minha formação profissional quanto na condução dos experimentos dessa dissertação;

- Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ;

- À Única e Somente Única Mansão Vaktôa e meus contemporâneos MDC, πcynão, Betuμ, Monstrim, Granada, K-diru, Ad-laid, Vanda, Figuerôa, Borçiña, Xeid-gra(s)²a, Zikdo, Jã-uilis, ½Faze, Bicxual e Agora-vai, por terem feito parte de minha formação profissional e pessoal desde 2007.

- À todos que contribuíram de alguma forma a este trabalho:

Muito Obrigado!

"A bit of advice. As you go the way of life, you will see a great chasm.

Jump. It is not as wide as you think".

Joseph Campbell

SUMÁRIO

RESUMO..... 13
ABSTRACT..... 15
1 INTRODUÇÃO..... 17
Referências..... 18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 21
Referências..... 29
3 CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Chloris polydactyla* AO HERBICIDA GLYPHOSATE..... 37
Resumo..... 37
Abstract..... 37
3.1 Introdução..... 38
3.2 Material e Métodos..... 42
3.2.1 Primeira etapa – "Screening" das populações coletadas no campo..... 42
3.2.2 Segunda etapa – Curvas de dose resposta ao glyphosate..... 49
3.2.3 Terceira etapa – Caracterização da dose de controle do capim branco (BHS)..... 51
3.2.4 Quarta etapa – Determinação do fator de resistência..... 51
3.3 Resultados e Discussão..... 52
3.3.1 Primeira etapa – "Screening" das populações coletadas no campo..... 52
3.3.2 Segunda etapa – Curvas de dose resposta ao glyphosate..... 54
3.3.3 Terceira etapa - Caracterização da dose de controle do capim branco (BHS)..... 60
3.3.4 Quarta etapa – Determinação do fator de resistência..... 65
3.4 Conclusões..... 75
Referências..... 76
4 ANÁLISE COMPARATIVA DO CRESCIMENTO DE BIÓTIPO DE CAPIM-BRANCO (*Chloris polydactyla*) RESISTENTE E SUSCETÍVEL AO GLYPHOSATE..... 81
Resumo..... 81
Abstract..... 81
4.1 Introdução..... 81
4.2 Material e Métodos..... 84
4.3 Resultados e Discussão..... 85

4.4 Conclusões..... 95
Referências..... 96
5 CONTROLE DA PLANTA DANINHA CAPIM-BRANCO (*Chloris polydactyla*) ATRAVÉS DE HERBICIDAS ALTERNATIVOS AO GLYPHOSATE..... 101
Resumo..... 101
Abstract..... 101
5.1 Introdução..... 101
5.2 Material e Métodos..... 105
5.3 Resultados e Discussão..... 109
5.4 Conclusões..... 116
Referências..... 117
6 MECANISMOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À PLANTA DANINHA *Chloris polydactyla* AO HERBICIDA GLYPHOSATE..... 121
Resumo..... 121
Abstract..... 121
6.1 Introdução..... 122
6.2 Material e Métodos..... 124
6.2.1 Absorção do herbicida glyphosate nos biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*..... 124
6.2.2 Absorção e Translocação do herbicida glyphosate em função do tempo em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*..... 126
6.2.3 Acúmulo de ácido chiquímico em biótipos resistente e suscetível ao glyphosate..... 128
6.2.4 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla* ao glyphosate..... 130
6.3 Resultados e Discussão..... 133
6.3.1 Absorção do herbicida glyphosate nos biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*..... 133
6.3.2 Absorção e translocação do herbicida glyphosate em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla* 134
6.3.3 Acúmulo de ácido chiquímico em biótipos resistente e suscetível ao glyphosate..... 141
6.3.4 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla* 143
6.4 Conclusões..... 146

Referências..... 146
ANEXO..... 151

RESUMO

Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*) ao herbicida glyphosate

Recentemente, tem sido constatadas falhas no controle da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla)* pelo herbicida glyphosate em áreas de culturas anuais e perenes no Brasil. Suspeita-se que estas falhas sejam decorrentes da seleção de populações resistentes desta planta daninha ao glyphosate. No entanto, até o momento, poucos relatos estão disponíveis na literatura caracterizando estas falhas. Esta pesquisa teve como objetivo a caracterização dos níveis de suscetibilidade de populações que apresentaram falha de controle, assim como estudar seus mecanismos de resistência. Também foi objetivo do trabalho analisar comparativamente o crescimento das populações suscetíveis e as supostamente resistentes ao glyphosate e avaliar a eficácia de herbicidas considerados alternativos ao glyphosate. Na primeira etapa, foram estudadas 87 populações do capim-branco vinda de diferentes regiões do Brasil, das quais duas sobreviveram ao experimento designado "screening". Esses dois biótipos, 59 e 69, juntamente com outras 15 populações suscetíveis, foram submetidos a experimentos de dose-resposta para a caracterização de suas suscetibilidades e determinação da dose eficiente de controle, da qual foi calculada em 705,41 g e.a. ha^{-1} de glyphosate. Em seguida, os biótipos supostamente resistentes foram comparados a um biótipo suscetível (34) para o cálculo do fator de resistência, que variou entre 3,92 e 7,95, confirmando a resistência dos biótipos. Não foi possível inferir claramente que existem diferenças de crescimento entre os biótipos resistente e suscetível que implicaria em custo adaptativo do biótipo resistente. No entanto, fica evidente que nas fases iniciais de crescimento, o biótipo 34S foi ou superior ou estatisticamente igual ao biótipo 69R. Não foi possível estabelecer uma relação entre diferenças de suscetibilidade entre os biótipos, portanto, a resistência do biótipo 69R ao glyphosate não alterou sua suscetibilidade aos herbicidas alternativos ao glyphosate aqui estudados. Na pós-emergência, clethodim e fenoxaprop-P-ethyl foram eficientes para controlar os biótipos 34S e 69R, enquanto que em pré-emergência, todos os herbicidas testados foram eficientes. O biótipo 69R absorveu menor quantidade de ^{14}glyphosate em relação ao biótipo 34S em todos os tratamentos, do qual foi estatisticamente inferior àqueles contendo ^{14}glyphosate + surfactante não-iônico (0,25%), ^{14}glyphosate + sulfato de amônio (3kg ha^{-1}) e ^{14}glyphosate isolado. O tratamento que proporcionou maior absorção para ambos os biótipos foi o ^{14}glyphosate + surfactante não-iônico. O biótipo 69R teve absorção máxima (Amax) 17% inferior ao biótipo 34S e maior retenção de ^{14}glyphosate na folha tratada. O acúmulo de ácido chiquímico no biótipo 34S foi 2,56 vezes maior que no biótipo 69R. Mutações no gene que codificam a EPSPs dos biótipos 34S e 69R não foram observadas. Por fim, baseando-se nos dados aqui obtidos, é possível afirmar que a absorção reduzida, bem como a maior retenção do ^{14}glyphosate nas folhas do biótipo 69R, possuem papel importante na resistência desse biótipo ao glyphosate.

Palavras-chave: Dose-resposta; Curva de crescimento; Controle químico; Mecanismo de resistência

ABSTRACT

Resistance of Tall windmill grass (*Chloris polydactyla*) to glyphosate

It has been recently observed failures in controlling Tall windmill grass (*Chloris polydactyla*) by glyphosate in agricultural areas in Brazil. It is suspected that these failures are due to selection of resistant biotypes to glyphosate. However, to date, few reports are available in the literature characterizing these failures. Therefore, this study aimed to characterize the levels of susceptibility of differents populations of *Chloris polydactyla*, and to study the possible mechanisms of resistance to glyphosate. It was also an objective of this study to build a comparative growth analysis between populations, as well as evaluating the effectiveness of alternatives herbicides to glyphosate. In the first step, 87 populations from different regions of Brazil were studied, of which two survived the experiment called "screening". These two biotypes, 59 and 69, along with 15 other susceptible populations were subjected to a dose- response experiment for the characterization and determination of their susceptibility to glyphosate and a baseline herbicide sensitivity was obteined, which was calculated in 705.41 g ae ha^{-1} of glyphosate. Then the supposedly resistant biotypes (59R and 69R) were compared to a susceptible population (34S) for calculate the resistance factor, which ranged from 3.92 to 7.95, confirming the resistance of the biotypes. It was impossible to infer accurately that there are differences in growth between the resistant and susceptible biotypes of Tall windmill grass, which would imply in fitness penalty for the resistant biotype. However, it is evident that in the early growth stages, in most of the variables analyzed, the 34S was biotype or higher or statistically equal to biotype 69R. It was not possible to establish a statistical difference in susceptibility among biotypes, therefore the resistance of 69R biotype to glyphosate did not alter its susceptibility to alternative herbicides. At post-emergence, clethodin and fenoxaprop-P-ethyl were efficient to control biotypes 34S and 69R. On the other hand, at pre-emergence, all herbicides were efficient to control both biotypes. The biotype 69R absorbed smaller amount of ^{14}glyphosate relative to 34S biotype in all treatments, which was statistically inferior to those containing ^{14}glyphosate + non-ionic surfactant (0.25%), ^{14}glyphosate + ammonium sulfate (3 kg ha^{-1}) and ^{14}glyphosate alone. The treatment providing greater absorption for both biotypes was ^{14}glyphosate + non-ionic surfactant. Biotype 69R absorbed 17% less than the biotype 34S and had higher treated leaf retention. The shikimic acid accumulation assay in the biotype 34S was 2.56 times higher than in biotype 69R. Mutations in the gene encoding EPSPs were not observed. Finally, based on data obtained here, it is clear that the reduced absorption and treated leaf retention of ^{14}glyphosate in biotype 69R, have an important role in the resistance of this biotype to glyphosate.

Keywords: Dose-response; Growth curve; Chemical control; Mechanism of resistance

1 INTRODUÇÃO

O capim branco (*Chloris polydactyla*) é uma planta daninha presente em diversas culturas agrícolas no Brasil, interferindo de forma significativa na produtividade agrícola. Sua infestação é tardia nos sistemas de produção, e ocorre com frequência no momento da dessecação da vegetação. Sendo assim, seu controle é normalmente feito através do uso do herbicida glyphosate. No entanto, nos últimos anos, tem sido observadas falhas de controle pelo glyphosate, suspeitando-se de mais um caso de seleção de plantas daninhas resistentes a este herbicida.

O primeiro passo após o surgimento de biótipos suspeitos de resistência de plantas daninhas a herbicidas com poucos ou nenhum relato na literatura é realizar testes experimentais comprobatórios da resistência (BURGOS et al., 2013; OWEN, 2011). Sendo assim, curvas de dose-resposta são realizadas com o intuito de comparar biótipos suspeitos de resistência com biótipos sabidamente suscetíveis (BECKIE et al., 2000).

Entretanto, para o caso do capim-branco existe um problema a mais neste tipo de pesquisa, que é o fato de não existir recomendação oficial de doses de glyphosate para o controle específico da planta daninha, apesar de ser possível encontrar recomendações para o gênero *Chloris spp.*, necessitando, portanto, desenvolver-se uma experimentação diferenciada para que primeiro seja determinada a dose de controle em populações suscetíveis, para depois fazer as comparações entre o biótipo suspeito e as populações selvagens não selecionadas, também conhecida como “Baseline Herbicide Sensitivity – BHS” (BURGOS et al., 2013).

Após comprovação de que a resistência existe, a etapa seguinte é determinar os mecanismos que conferem resistência a esses biótipos, pois, segundo Merotto Jr. et al. (2010), o conhecimento do mecanismo de resistência de plantas daninhas a herbicidas é necessário para a determinação das práticas de manejo mais adequadas. Testes devem ser feitos em populações que foram selecionadas no campo e seus descendentes.

Existem diversas formas de classificar os mecanismos que conferem resistência a herbicidas. De uma forma simplificada, é possível classificar os mecanismos de resistência em dois tipos: (a) relacionados ao sítio de ação – TSR (target-site-based resistance) (CARVALHO et al., 2012; GAINES et al., 2010; ALACÓN-REVERTE et al., 2013; NANDULA et al., 2013) e (b) não-relacionados ao sítio de ação – NTSR (non target-site-based resistance) (CARVALHO et al., 2012; NANDULA et al., 2013; GE et al., 2012).

Também é necessário determinar herbicidas alternativos ao glyphosate. Os herbicidas alternativos são considerados aqueles com diferentes mecanismos de ação que podem ou não

ser associados ao glyphosate ou mesmo serem aplicados isoladamente, e que tem eficácia de controle tanto nos biótipos resistentes quanto suscetíveis ao glyphosate (WALSH; POWLES, 2007).

A biologia da planta daninha deve ser também estudada comparando o biótipo resistente com o suscetível, principalmente no aspecto de adaptabilidade ecológica, uma vez que alguns mecanismos de resistência como translocação diferencial no biótipo resistente ou mutação na EPSPs podem causar a penalidade adaptativa, ou seja, menor habilidade do biótipo resistente em produzir massa seca, sementes ou mesmo raízes (PRESTON et al., 2009; VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009). Este tipo de comparação pode ser feito através da elaboração de curvas de crescimento comparativa entre os biótipos (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE, 1997; SOUZA et al., 2012).

Baseando-se nestes aspectos, foi desenvolvida essa pesquisa com os objetivos de estudar populações da planta daninha capim-branco com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate, mensurar o nível de resistência comparando populações com suspeita de resistência com populações suscetíveis, pesquisar os mecanismos que conferem resistência a esses biótipos, propor controles químicos alternativos a essas populações não mais controladas pelo glyphosate e fazer análise de crescimento comparativa entre os biótipos.

Referências

ALACÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; URZÚA, J.; FISCHER, A. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 48-54, 2013.

BECKIE, H.J.; HEAP, I.M.; SMEDA, R.J.; HALL, L.M. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, Lawrence, v. 14, p. 428–445, 2000.

BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; STREIBIG, J.A.; DAVIS, V.M.; SHANER, J.L.; NORSWORTHY, J.K.; RITZ, C. Review: confirmation of resistance to herbicides and evolution of resistance levels. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 4-20, 2013.

CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; ROJANO-DELGADO, A.M.; DE PRADO, R. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, p. 615-622, 2012.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; WESTRA, P. MOORE, F. Growth analysis of sulfonylurea-resistant and –susceptible Kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, Lawrence, v. 45, p. 691-695, 1997.

GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, p. 1029–1034, 2010.

GE, X.; D'AVIGNON, A.; ACKERMAN, J.J.H.; COLLAVO, A.; SATTIN, M.; OSTRANDER, E.L.; HALL, E.L.; SAMMONS, D.; PRESTON, C. Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium spp.*) from Australia, South America, and Europe: A ^{31}P NMR investigation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, p. 1243-1250, 2012.

MEROTTO JUNIOR, A; KUPAS, V.R.; NUNES, A.L.; GOULART, I.C.G.R. Isolamento do gene ALS e investigação do mecanismo de resistência a herbicidas em Sagittaria montevidensis. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2381-2384, 2010.

NANDULA, V.K.; RAY, J.D.; RIBEIRO, D.N.; PAN, R.Z.; REDDY, K.N. Glyphosate resistance in Tall Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and non target-site mechanisms. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, p. 374-383, 2013.

OWEN, M.D.K. Weed resistance development and management in herbicide-tolerant crops: experiences from the USA. **Journal Für Verbraucheschutz and Lebensmittelsicherheit**, Berlin, v. 6, p. 85-89, 2011.

PRESTON, P.; WAKELIN, A.M.; DOLMAN, F.C.; BOSTAMAN, Y.; BOUTSALIS, P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 435-441, 2009.

SOUZA, R.C.; DIAS, A.C.; FIGUEIREDO, M.R.A.; OBARA, F.E.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Growth of the Crabgrass species *Digitaria ciliaris* and *Digitaria nuda*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 30, p. 317-325, 2012.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, Lancaster, v. 184, p. 751-767, 2009.

WALSH, M.J.; POWLES, S.B. Management strategies for herbicide-resistant weed population in Australian dryland crop production systems. **Weed Technology**, Lawrence, v. 21, p. 332-338, 2007.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Chloris* pertencente à família botânica Poaceae, subfamília Eragrostoideae, e é composto por cerca de 40 espécies, das quais são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. Algumas dessas espécies foram introduzidas no Brasil para serem forrageiras, como é o caso da espécie *Chloris gayana*. Além desta, podem também ser citadas as espécies *Chloris pycnothrix*, *Chloris grandiflora*, *Chloris barbata* e *Chloris polydactyla* como sendo comuns no território brasileiro. Seus nomes populares variam de região para região, e podem ser chamados de capim-pé-de-galinha, capim-guayamum, capim-de-rhodes, capim-cebola, capim-fino, grama-azul, graminha-de-campinas, falso-capim-de-galinha ou, mais comumente conhecido no estado de São Paulo, como capim-branco (LORENZI, 2008).

A planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla* (L.) Sw.) é nativa do continente americano, possuindo ampla distribuição geográfica, encontrada desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Possui ciclo fotossintético do tipo C4, perene, ereta, pouco cespitosa, de colmos glabros e sub-cilíntricos, pode ter sua altura variando de 50 a 110 cm, a qual se propaga tanto por sementes quanto por rizomas. (LORENZI, 2008). No Brasil, o capim-branco é bastante comum em todas as regiões geográficas, mais comumente encontrado em áreas agrícolas das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, onde pode ser visto quase o ano todo em floração. Como planta daninha, é considerada medianamente frequente, encontrada principalmente em beira de estradas, pastagens e em pomares.

A interferência causada pela infestação das plantas daninhas é considerada um dos maiores redutores da produtividade agrícola em um sistema de produção, uma vez que esses agentes biológicos competem principalmente por água, luz e nutrientes com a cultura. Alguns autores inferem sobre culturas de importância econômica e social a nível mundial, como soja, milho, algodão e citros, e relatam que essas culturas podem sofrer perdas diretas da ordem de 53% (CARVALHO, 1993), 100% (BLANCO et al., 1976), 95% (DEUBER, 1999) e 25% (CARVALHO et al., 2003), respectivamente, caso medidas adequadas de manejo não forem adotadas no momento certo. Além da redução do potencial produtivo pela interferência direta das plantas daninhas sobre a cultura de interesse econômico, as plantas daninhas também podem ter intervenção indireta, dificultando a colheita, depreciando o produto final, diminuindo a longevidade das culturas perenes e, em alguns casos, certas plantas daninhas podem ser hospedeiras alternativas de pragas como insetos, fungos, nematoides, bactérias e vírus. As plantas daninhas também podem liberar compostos ao solo, conhecido como compostos alelopáticos (MULLER, 1966), que inibem e/ou interferem em rotas metabólicas

da cultura de interesse, causando interferência química no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Os objetivos do manejo de plantas daninhas nas culturas são de minimizar as perdas devido à interferência, beneficiar as condições de colheita, reduzir o incremento do banco de sementes de plantas daninhas, evitar a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas, e tudo isso com a menor contaminação ambiental possível e maior lucratividade. Segundo Oliveira Jr. et al. (2011), a utilização de herbicidas para o controle de plantas daninhas se tornou a prática mais utilizada, uma vez que é uma técnica de menor custo, quando comparado com outros métodos de controle, e de alta eficácia agronômica de controle das plantas daninhas.

O glyphosate é o herbicida mais utilizado no mundo, e vem sendo aplicado há mais de 40 anos nos mais variados sistemas de produção. A adoção de culturas resistentes a este herbicida e a queda da sua patente no ano de 2000 podem ser citados como fatores decisivos para sua ampla aceitabilidade e adoção (DUKE; POWLES, 2008; GIANESSI, 2004). Esse herbicida tem como mecanismo de ação a inibição da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (EC 2.5.1.19), que é a responsável pela reação de conversão do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em EPSP e fosfato inorgânico, na rota do ácido chiquímico (GEIGER; FUCHS, 2002). Segundo Boudet, Graziana e Ranjeva (1985), esta rota metabólica pode ser responsável por cerca de 20% de todo o fluxo de carbono e 35% de todos os compostos fenólicos produzidos na planta. A inibição da EPSPs resulta no acúmulo de ácido chiquímico nas plantas e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina, fundamentais na alocação do carbono nas plantas, além de interferir na produção de flavonas, isoflavonas, antocianinas, taninos condensados, ligninas e outros compostos fundamentais para o desenvolvimento vegetal (AMRHEIN et al., 1980; TAIZ; ZEIGER; 2009).

As plantas daninhas, como quaisquer outros seres vivos, estão continuamente evoluindo, portanto, sujeitas à seleção natural. A resistência de plantas daninhas a herbicidas nada mais é do que a seleção natural atuando em uma população selvagem devido à ação de um agente selecionador. O resultado dessa seleção, neste caso a presença de biótipos resistentes, vem sendo um dos maiores desafios nos sistemas agrícolas recentemente, sobretudo pelo fato de um número exponencial de novos casos de resistência terem sido reportados nas últimas décadas nos mais diversos sistemas de produção, associados principalmente à alta dependência de herbicidas (JASIENIUK et al., 2008). Até o momento,

218 espécies de plantas daninhas em 65 países foram identificadas como sendo resistentes a herbicidas em pomares, lavouras, pastagens e áreas não agrícolas (HEAP, 2014).

O surgimento de biótipos resistentes ocorre, com maior frequência, em áreas onde há uso repetido de herbicidas de um mesmo grupo químico ou pertencentes a diferentes grupos químicos, mas com o mesmo mecanismo de ação (DUKE; POWLES, 2008; POWLES; YU, 2010). Segundo Gunsolus (2008), biótipo pode ser definido como um conjunto de indivíduos, dentro de uma população, que possuem características fenotípicas semelhantes, mas que diferem em poucas características genéticas. A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Os mecanismos que conferem resistência aos herbicidas nas plantas daninhas podem ser classificados como: (i) alteração no sítio de ação que o herbicida atua (NG et al., 2003; KAUNDUN et al., 2008; WAKELIN; PRESTON, 2006; YU; CARNS; POWLES, 2007; PEREZ-JONES et al., 2007; GAINES et al., 2010); ou (ii) diminuição da quantidade de herbicida que chega ao sítio de ação (POWLES; PRESTON, 2006; DINELLI et al., 2008; YU et al., 2009; GE et al., 2010; SHANER; LINDENMEYER; OSTLIE, 2011). Pesquisas apontam que o manejo no sistema de produção pode inferir se haverá o aparecimento de biótipos resistentes devido à alteração no sítio de ação do herbicida ou na quantidade que atinge o sítio de ação. O uso de dosagens de herbicidas superiores àquelas recomendadas em rótulo podem selecionar biótipos com resistência por alteração no sítio de ação do herbicida e doses abaixo da recomendada tendem a selecionar biótipos com a habilidade de diminuir a quantidade de herbicida que atinge o sítio de ação (GARDNER; GRESSEL; MANGEL, 1998).

Alacón-Reverte et al. (2013), por exemplo, estudaram biótipos de capim-arroz (*Echinochloa colona*) oriundos do norte da Califórnia quanto a sua suscetibilidade ao glyphosate. Primeiramente, foi feito um experimento de dose-resposta e encontraram fator de resistência de 6,6, ou seja, a razão entre a dose de glyphosate necessária para reduzir o crescimento em 50% do biótipo resistente pelo suscetível foi 6,6 ou, em outras palavras, foram necessárias 6,6 vezes mais herbicida aplicado no biótipo resistente para igualar um dano de 50% causado ao biótipo suscetível. Em seguida, foi feito o experimento de acúmulo

de chiquimato através da metodologia de Shaner et al. (2005), e esse fator de resistência se reduziu para 5,0, quando estes foram quantificados quatro dias após a aplicação de glyphosate. A metodologia de avaliação do acúmulo de chiquimato por meio de discos foliares é muito utilizada como um experimento complementar quando se intenciona descobrir o mecanismo de resistência ao glyphosate, uma vez que o não acúmulo de ácido chiquimíco pode se correlacionar com a insensibilidade da EPSPs, indicando a possível mutação no gene que a codifica, ou mesmo amplificação gênica no código genético. Em seguida, com a finalidade de encontrar o mecanismo de resistência, foi realizado um experimento para avaliar a absorção e translocação do herbicida aplicado em uma folha para o restante da planta, e foi concluído que não havia diferenças nem na absorção nem na translocação entre os biótipos resistente e suscetível. Por fim, através de técnicas moleculares, foi realizado o sequenciamento parcial do gene que codifica a EPSPs, e foi encontrada uma mutação na posição 106, com substituição do aminoácido prolina por uma serina, mas esta substituição pode também ser por outro aminoácido, como threonina, alanina ou leucina (PEREZ-JONES et al., 2007; YU; CAIRNS; POWLES, 2007; PRESTON et al., 2009; WAKELIN; PRESTON, 2006; KAUNDUN et al., 2008). Essa mesma mutação é também documentada por Perez-Jones et al. (2007) na planta daninha *Lolium multiflorum,* em biótipos do Chile e EUA. Apesar desse mecanismo de resistência conferir baixo fator de resistência comparado com aquele que as culturas geneticamente modificadas possuem, as plantas daninhas com esse tipo de mutação são capazes de sobreviver após a exposição à dose recomendada de campo (PADGETT et al., 1996).

Koger e Reddy (2005) estudaram biótipos de *Conyza canadenses* dos estados de Mississippi, Arkansas e Delaware (EUA) quanto a suas suscetibilidades ao glyphosate e os mecanismos de resistência que a conferem. Os autores concluíram que havia diferenças entre os biótipos resistentes e suscetíveis, de forma que os biótipos resistentes chegavam a translocar de 24 a 48% menos glyphosate marcado do que os biótipos suscetíveis após 48 horas dos tratamentos. Resultados semelhantes foram obtidos por Riar et al. (2011) e Vila-Aiub et al. (2011) em capim-massambará (*Sorghum halepense*), por Feng et al. (2004) em buva (*Conyza canadenses*) e por Perez, Alister e Kogan (2004) em azevém (*Lolium multiflorum*).

Recentemente, foi descoberto por Xia et al. (2010) um novo indício que fornece maiores elucidações de como a translocação diferenciada entre biótipos suscetíveis e resistentes ocorre. Utilizando-se de glyphosate marcado em seu átomo ^{31}P e NMR (Nuclear

Magnetic Resonance), os autores avaliaram o comportamento do herbicida dentro de biótipos resistentes e suscetíveis de buva (*Conyza canadenses*) ao longo do tempo in *vivo*. Na avaliação de 24 horas após o tratamento dos biótipos com glyphosate, constatou-se a presença de 85% do herbicida dentro dos vacúolos do biótipo resistente, enquanto que apenas 15% foi constatado nos vacúolos do biótipo suscetível. Esses dados explicam a diminuta translocação observada por Feng et al (2004) e Koger e Reddy (2005) em biótipos dessa mesma espécie. O transporte do citoplasma para o vacúolo, uma vez que a barreira do tonoplasto deve ser quebrada, é explicada pela existência de uma proteína carregadora em maior concentração/específica do biótipo resistente (YUAN; TRANEL; STEWART, 2006).

Segundo Shaner (2009), a absorção reduzida e consequente translocação diferencial pode ser devido a quatro fatores: (a) alteração do transportador de fosfato responsável por levar o glyphosate até o interior da célula por transporte ativo, podendo essa alteração ser total, ou seja, o transportador não mais reconhece o glyphosate; (b) evolução de um novo transportador que carrega o glyphosate para o vacúolo, prevenindo o glyphosate de atingir tanto o floema quanto o cloroplasto; (c) evolução de um novo transportador, que bombeia o glyphosate por transporte ativo para fora da célula diretamente para o apoplasto e; (d) evolução de um transportador na membrana do cloroplasto que bombeia o glyphosate para fora do cloroplasto, prevenindo que o herbicida atinja o sítio de ação. A absorção e/ou translocação diferencial pode conferir resistência a plantas daninhas com fatores de resistência que variam entre 3 e 10.

Da mesma maneira que a translocação e absorção diferencial podem diminuir a quantidade de herbicida que atinge o sítio de ação, também existem casos de resistência de plantas daninhas por meio da metabolização da molécula de herbicida. A metabolização, didaticamente, é dividida em quatro fases: desintoxicação, conjugação, transporte e armazenamento. Na primeira fase pode acontecer a oxidação, redução ou hidrólise, reações que tornam a molécula de herbicida menos fitotóxica e, na maioria dos casos, essa reação é realizada pela família fitocromo P450 (WERCK-REICHHART, 2000; YUN et al., 2000). Durante a fase II, a molécula derivada da fase I sofre conjugação com açúcares, aminoácidos ou tripeptídios por meio de enzimas como a glutationa, heme-glutationa ou glucose, tornando a molécula menos fitotóxica e mais hidrossolúvel. Alguns herbicidas que possuem determinados radicais podem vir diretamente para a fase de conjugação, não precisando passar pela fase de desintoxicação (ANDERSON; GRONWALD, 1991; READE; MILNER; COBB, 2004). Já na fase III, os compostos provindos da fase II são transportados para o

vacúolo ou espaço extracelular por transporte ativo. Transportadores ABC são o grupo mais comum de compostos que participam dessa etapa da metabolização de herbicidas em plantas (BARTHOLOMEW et al., 2002; KLEIN; BURLA; MARTINOIA, 2006). Por fim, a fase IV envolve futura degradação da molécula resultantes da fase III, podendo até ser incorporadas futuramente em membranas celulares ou em algum outro composto celular.

Por outro lado, algumas plantas daninhas podem desenvolver resistência a herbicidas através de mais de um mecanismo fisiológico/bioquímico, não se limitando a apenas uma característica evolutiva. Nandula et al. (2013) estudaram a suspeita de resistência de *Amaranthus tuberculatus* do Mississippi ao glyphosate por meio de experimento de dose-resposta, absorção e translocação com glyphosate radioativo, acúmulo de ácido chiquímico e sequenciamento genético. Os autores confirmaram a resistência do biótipo estudado, obtendo fator de resistência 5, observaram que o biótipo suscetível absorvia e translocava mais glyphosate que o biótipo resistente. Além disso, os autores identificaram uma mutação no gene que codifica a EPSPs: a substituição de uma prolina por uma serina na posição 106.

Dentre as principais consequências da resistência de plantas daninhas a herbicidas, pode-se enumerar, segundo Christoffoleti e López-Ovejero (2008), a restrição ou inviabilidade da utilização de herbicidas importantes para certos sistemas de produção, perdas de áreas de plantio, perdas de rendimento e qualidade dos produtos das culturas agrícolas, necessidade de uma segunda entrada na área para o uso de um manejo mais eficiente (do qual pode aumentar a compactação do solo e o custo do produto final), mudanças no sistema de produção e, em alguns casos, aumento das doses de herbicidas, que tem como consequência o maior impacto ambiental e elevação dos custos de produção, com consequente redução da competitividade na comercialização do produto final.

O predomínio de um biótipo resistente ao glyphosate aparece, normalmente, em áreas onde esse herbicida é usado com pouca ou nenhuma diversidade de práticas de manejo (BECKIE, 2011). A diversidade nos sistemas de manejo de plantas daninhas se refere à associação e/ou sequência de herbicidas com diferentes mecanismos de ação durante o mesmo ciclo da cultura, ou entre as rotações de culturas, acompanhadas de rotação de herbicidas, ou mesmo a utilização de ferramentas alternativas às químicas no sistema de produção.

No Brasil, até o momento, foram confirmadas 32 espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas, que incluem os inibidores da ALS (GAZZIERO et al., 1998), inibidores da ACCase (VIDAL et al., 2006; LÓPEZ-OVEJERO et al., 2005), auxinas

sintéticas (ANDRES et al., 2007), inibidores da EPSPs (CARVALHO et al., 2011), inibidores da PPO (TREZZI et al., 2006) e inibidores do fotossistema II (FRANCISCHINI; OLIVEIRA JR; CONSTANTIN, 2012). Desde a ampla adoção de culturas geneticamente modificadas com resistência ao glyphosate, bem como a ampla adoção de um sistema agrícola dependente desse ingrediente ativo, biótipos resistentes ao glyphosate vêm sendo selecionados em culturas como milho, soja e pomares diversos. No Brasil, foram identificados biótipos de buva [*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist] (VARGAS et al., 2007), voadeira [*Conyza canadensis* (L.) Cronquist] (LAMEGO; VIDAL, 2008; MOREIRA et al., 2007), avoadinha [*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker] (SANTOS, 2012), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2004) e capim-amargoso [*Digitaria insularis* (L.) Fedde] (CARVALHO et al., 2011).

Dentre as práticas agronômicas que se relacionam com a seleção de biótipos resistentes estão o uso de doses de herbicidas acima da recomenda, uso de doses de herbicidas abaixo da recomendada (MANALIL et al., 2011), utilização de um mesmo mecanismo de ação repetidamente por um longo período e aplicação de herbicidas com efeito residual muito prolongado. Por outro lado, não são apenas as práticas agronômicas que influenciam a seleção de plantas daninhas resistentes a herbicidas, mas também, segundo Matiello et al. (1999), fatores genéticos da planta (frequência inicial de biótipos resistentes, dominância dos genes que proporcionam resistência, tipo de fecundação e adaptação ecológica) e bioecológicos (número de gerações por ano, taxa de reprodução, longevidade dos propágulos no solo e suscetibilidade da planta ao herbicida). Modelagem computacional para tentar prever o aparecimento de biótipos resistentes e a qual nível eles serão resistentes, nos últimos anos, vêm sendo uma ferramenta muito utilizada por pesquisadores (GRESSEL, 2009; GUSTAFSON, 2008; NEVE, 2008; NEVE et al., 2011).

Alguns biótipos dentro de uma população podem ter se diferenciado do restante da população por serem resistentes a herbicidas, podendo ter diferente acúmulo de massa seca, diferente área foliar total e produção de sementes diferenciada, na maioria das vezes menor que o biótipo suscetível, característica esta chamada penalidade adaptativa. Normalmente, segundo Jasieniuk et al. (1996), esses biótipos com penalidade adaptativa não são comuns em uma população quando não existe a presença do herbicida, por estes biótipos serem menos favorecidos adaptativamente, dos quais são dominados por competição intra-específica. Entretanto, na presença do herbicida, esses indivíduos tem a habilidade de sobreviver após a exposição do herbicida e reproduzir-se. A penalidade adaptativa pode explicar em partes

porque a resistência ao glyphosate demorou mais tempo para aparecer do que a resistência a outros herbicidas. Segundo Bradshaw et al. (1997) a penalidade adaptativa associada a resistência de plantas daninhas ao glyphosate é maior do que a penalidade adaptativa que as plantas daninhas possuem a outros herbicidas, sendo essa penalidade suficiente para suprimir os biótipos resistentes em meio a população sem a presença do herbicida.

Diferenças relacionadas à penalidade adaptativa de biótipos resistentes ao glyphosate foram documentadas por Pederson et al. (2007) e Preston e Wakelin (2008) em *Lolium rigidum*. Por outro lado, Giacomini et al. (2014) não encontraram diferenças quanto ao crescimento de biótipos resistentes e suscetíveis ao glyphosate em *Amaranthus palmeri*, da mesma forma que Melo (2011) em *Digitaria insularis*.

Pesquisas recentes foram realizadas no Brasil, mais especificamente nos estados do Paraná e São Paulo, das quais foram coletadas sementes de capim-amargoso em 62 diferentes municípios para verificar a possibilidade de resistência ao glyphosate. Desses 62 municípios, 28 tiveram casos confirmados de resistência e 16 foram considerados pelos autores como “em potencial para a seleção de biótipos resistentes” (MELO et al., 2013). Na região Centro-Oeste, que inclui os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, foram estudadas 28 populações de capim-amargoso de diferentes cidades, das quais nove foram confirmadas como resistentes e oito consideradas pelos autores como populações potencialmente resistentes (CHRISTOFFOLETI et al., 2013). Trabalho semelhante foi realizado por Vargas et al. (2010), que avaliaram 205 populações de *Conyza spp.* de diferentes regiões de Rio Grande do Sul. Os resultados confirmaram a resistência em 122 populações.

O conhecimento do mecanismo de resistência de plantas daninhas a herbicidas é necessário para a determinação de práticas de manejo que previnam a ocorrência de novos biótipos resistentes em outras áreas e, principalmente, para o estabelecimento de programas de manejo preventivo à seleção de biótipos resistentes, além da determinação das práticas de controle das plantas resistentes já selecionadas (MEROTTO Jr. et al., 2010). Somente a partir da integração do conhecimento das características genéticas, bioecológicas e agronômicas, será possível fazer o planejamento adequado dos sistemas de produção como um todo para que a sustentabilidade do sistema agrícola seja atingida.

Referências

ALACÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; URZÚA, J.; FISCHER, A. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 48-54, 2013.

AMEHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate, II: interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 66, p. 830-834, 1980.

ANDERSON, M.P.; GRONWALD, J.W. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 96, p. 104-109, 1991.

ANDRES, A.; CONCENÇO, G.; MELO, P. T. B. S.; SCHMIDT, M.; RESENDE, R. G. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa spp*.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, p. 221-226, 2007.

BARTHOLOMEW, D.M.; VAN DYK, D.E.; LAU, S.M.; O'KEEFE, D.P.; REA, P.A.; VIITANEN, P.V. Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 130, p. 1562-1572, 2002.

BECKIE, J.H. Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. **Pest Management Science**, Malden, v. 67, p. 1037-1048, 2011.

BLANCO, H.G.; ARAUJO, J.B.M.; OLIVEIRA, D.A. Estudo sobre competição das plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.). IV. Determinação do período de competição**.** **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 43, n. 3/4, p. 105-114, 1976.

BOUDET, A.M.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: VAN SUMERE, C.F.; LEA, P J. (Ed.). **Biochemistry of plant phenolics**. Oxford: Claredon Press, 1985. p. 135-159.

BRADSHAW, L.D.; PADGETTE, S.R.; KIMBALL, S.L.; WELLS, B.H. Perspectives on glyphosate resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, p. 189-198, 1997.

CARVALHO, F.T. **Integração de práticas culturais e dosagens de herbicida aplicado em pós-emergência, no controle de plantas daninhas e produtividade da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. 1993. 94 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciencias Agronômicas e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1993.

CARVALHO, J.E. B.; PITELLI, R.A.; MONTEZUMA, M.C.; CALDAS, R.C. **Efeito de períodos de controle de plantas daninhas na produtividade de citros em São Paulo**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico, 86).

CARVALHO, L.B.; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.L.C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRATO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, n. 2, p. 171-176, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: _____. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 9-29.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; MELO, M.S.C.; NICOLAI, M.; LOPEZ-OVEJERO, R.F.; BRUNHARO, C.A.C.G.; OBARA, F.E.B. A survey for glyphosate resistance in sourgrass (*Digitaria insularis*) from the Midwest region of Brazil. In: GLOBAL HERBICIDE RESISTANCE CHALLENGE, 1. , 2013, Perth. **Proccedings…** Perth: AHRI, 2013. p. 37.

DEUBER, R. Manejo de plantas infestantes na cultura do algodoeiro. In: CIA, E.; FREIRE, E.C.; SANTOS, J.W. (Ed.). **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Potafos, 1999. p. 4-12.

DINELLI, G.; MAROTTI, I., CATIZONE, P.; BONETTI, A.; URBANO, J.M.; BARNES, J. Physiological and molecular basis of glyphosate resistance in *C. bonariensis* (L.) Cronq. biotypes from Spain. **Weed Research**, Oxford, v. 48, p. 257–265, 2008.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 319–325, 2008.

FENG, P.C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, D.; HECK, G.R.; CAJACOB, C.A. Investigation into GR horseweed (*Conyza Canadensis*): retention, uptake, translocation and metabolism. **Weed Science**, Lawrence, v. 52, p. 498-505, 2004.

FRANCISCHINI, A. C.; OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J. Primeiro relato de resistência a herbicidas em espécies de caruru no Brasil. **Informe técnico PGA-UEM**, Maringá, v. 1, n. 2, p. 1-4, nov. 2012.

GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, p. 1029–1034, 2010.

GARDNER, S.N.; GRESSEL, J.; MANGEL, M. A revolving dose strategy to delay the evolution of both quantitative vs. major monogene resistances to pesticide and drugs. **International Journal of Pest Management,** London, v. 44, p. 161-180, 1998.

GE, X.; D'AVIGNON, A.; ACKEMAN, J.J.H.; SAMMONS, R.D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, p. 345–348, 2010.

GEIGER, D.R.; FUCHS, M.A. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (Ed.). **Herbicide classes in development**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 59-85.

GIACOMINI, D.; WESTRA, P.; WARD, S.M. Impact of genetic background in fitness cost studies: an exemple from glyphosate-resistant Palmer Amaranth. **Weed Science**, Lawrence, v. 62, p. 29-37, 2014.

GIANESSI, L.P. Economic and herbicide use impacts of GR crops. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 124-245, 2004.

GRAZIERO, D. L. P.; BRIGHETI, A. M.; MACIEL, C. D. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; ADEGAS, F. S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 16, p. 117-125, 1998.

GRESSEL, J. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, Malden, v. 65, p. 1164-1173, 2009.

GUNSOLUS, J.L. **Herbicide resistant weeds**. Disponível em: <www.extension.umn.edu/agriculture/crops/weed-management/herbicide-resistant-weeds>. Acesso em: 11 abr. 2014.

GUSTAFSON, G.I. Sustainable use of glyphosate in North American cropping systems. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 409-416, 2008.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. 2014. Disponível em: <www.weedscience.com>. Acesso em: 07 abr. 2014.

JASIENIUK, M.; AHMAD, R.; SHERWOOD, A.M.; FIRESTONE, J.L.; PEREZ-JONES, A.; LANINI, W.T.; MALLORY-SMITH, C.; STEDNICK, Z. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 496–502, 2008.

JASIENIUK, M.; BRULE-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, Lawrence, v. 44, p. 176-193, 1996.

KAUNDUN, S.V.; ZELAYA, I.A.; DALE, R.P.; LYCETT, A.J.; CARTER, P.; SHARPLES, K.R.; MCINDOE, E. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Phillippines. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 637–646, 2008.

KLEIN, M.; BURLA, B.; MARTINOIA, E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 580, p. 1112-1122, 2006.

KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza Canadensis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 53, p. 84-89, 2005.

LAMEGO, F.P. VIDAL, R.A. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, p. 467–471, 2008.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; PENCKOWSKI, L. H.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de populações de capim-colchão (*Digitaria ciliaris*) aos herbicidas inibidores da acetil Co-A carboxilase. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, p. 543-549, 2005.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 672 p.

MANALIL, S.; BUSI, R.; RENTON, M.; POWLES, S.B. Rapid evolution of herbicide resistance by low dosages. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 210-217, 2011.

MATIELLO, R.R.; RONZELLI JÚNIOR, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agronômicos e genéticos. In: CURSO DE MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS, 2., 1999, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: AEACG, 1999. p. 27-40.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate.** 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MELO, M.S.C.; NICOLAI, M.; LOPEZ-OVEJERO, R.F.; OBARA, F.E.B.; BRUNHARO, C.A.C.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J. A survey for glyphosate resistance in sourgrass (*Digitaria insularis*) from Parana and Sao Paulo States in Brazil. In: GLOBAL HERBICIDA RESISTANCE CHALLENGE, 1., 2013, Perth. **Proccedings…** Perth: AHRI, 2013. p. 39.

MEROTTO JUNIOR, A.; KUPAS, V.R.; NUNES, A.L.; GOULART, I.C.G.R. Isolamento do gene ALS e investigação do mecanismo de resistência a herbicidas em *Sagittaria montevidensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2381-2384, 2010.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadenses* e *C. bonariensis* ao herbicida ghyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

MULLER, C.H. The role of chemical inhibition (allelophaty) in vegetation composition. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 93, p. 332-351, 1966.

NANDULA, V.K.; RAY, J.D.; RIBEIRO, D.N.; PAN, R.Z.; REDDY, K.N. Glyphosate resistance in Tall Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, p. 374-383, 2013.

NEVE, P. Simulation modeling to understand the evolution and management of glyphosate resistant weeds. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 392-401, 2008.

NEVE, P.; NORSWORTHY, J.K.; SMITH, K.L.; ZELAYA, I.A. Modeling evolution and management of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Weed Research**, Oxford, v. 51, p. 99-112, 2011.

NG, C.H.; WICKENSWARY, R.; SALMIJAH, S.; TENG, Y.T.; ISMAIL, B.S. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, Oxford, v. 43, p. 108–115, 2003.

OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. 348p.

PADGETT, S.R.; RE, D.B.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.E.; DELANNAY, X.; FUCHS, R.L.; KISHORE, G.M.; FRALEY, R.T. New weed control opportunities: development of soybeans with Roundup Ready gene. In: DUKE, S.O. (Ed.). **Herbicide resistant crops**: agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects. Boca Raton: CRC Lewis, 1996. p. 53-84.

PEDERSON, B.P.; NEVE, P.; ANDREASEN, C.; POWLES, S.B. Ecological fitness of a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population: growth and seed production along a competition gradient. **Basic Applied Ecology,** Gottingen, v. 8, p. 258–268, 2007.

PEREZ, A.; ALISTER, C.; KOGAN, M. Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resitant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. **Weed Biology Management**, London, v. 4, p. 56-58, 2004.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K-W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berkeley, v. 226, p. 395–404, 2007.

POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology,** Lawrence, v. 20, p. 282–289, 2006.

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 317–347, 2010.

PRESTON, C.; WAKELIN, A.M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 372–376, 2008.

READE, J.P.H.; MILNER, L.; COBB, A.H. A role for glutathione S-tranferase in resistance to herbicides in grasses. **Weed Science**, Lawrence, v. 52, p. 254-263, 2004.

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; JOHNSON, D.B.; SCOTT, R.C.; BAGAVATHIANNAN, M. Glyphosate resistance in a Johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 299-304, 2011.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistance of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) to glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, p. 301–306, 2004.

SANTOS, G.; OLIVEIRA Jr.; R.S.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, M.F.P.S. Buva com resistência múltipla a herbicidas é identificada como *Conyza sumatrensis* no Paraná. **Informe técnico PGA-UEM**, Maringá, v. 1, n. 1, p. 1-3, mar. 2012.

SHANER, D.L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 118-123, 2009.

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

SHANER, D.L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, W.B.; KOGER, C.H. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, Lawrence, v. 53, p. 769-774, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; KRUSE, N. D.; NUNES, A. L. Bioensaios para identificação de biótipos de Euphorbia heterophylla com resistência múltipla a inibidores da ALS e PROTOX. **Planta Daninha**, v. 24, p. 563-571, 2006.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotypes in apple orchards. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, p. 617–622, 2004.

VARGAS, L.; BIANCHI, M.A.; RIZZARDI, M.A.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. *Conyza bonariensis* biotypes resistant to the glyphosate in Southern Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, p. 573–578, 2007.

VARGAS, L.; NOHATTO, M.A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M.A.; GONÇALVES, E.M.; POLIDORO, E. Mapeamento da ocorrência de biótipos de *Conyza* spp. resistente ao herbicida glyphosate no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 26., 2010, Ribeirão Preto. **Resumos expandidos...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 909-913.

VIDAL, R. A.; PORTES, E. S.; LAMEGO, F. P.; TREZZI, M. M. Resistência de Eleusine indica aos inibidores de ACCase. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, p. 163-171, 2006.

VILA-AIUB, M.M.; BALBI, M.C.; DISTÉFANO, A.J.; FERNÁNDEZ, L.; HOPP, E.; YU, Q.; POWLES, S.B. Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. **Pest Management Science**, Malden, v. 68, p. 430-436, 2011.

WAKELIN, A.M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 432–440, 2006.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; GIDJERJEAN, L. Citochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 5, p. 107-114, 2000.

XIA, G.; D'AVIGNON, S. A.; ACKERMAN, J. J. H.; SAMMONS, D. R. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, p. 345-348, 2010.

YU, Q.; CAIRNS, A.; POWLES, S. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta**, Berkeley, v. 225, p. 499–513, 2007.

YU, Q.; ABDALLAH, I.; HAN, H.P.; OWEN, M.; POWLES, S.B. Distinct nontarget-site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* populations. **Planta**, Berkeley, v. 230, p. 713–723, 2009.

YUAN, J.S.; TRANEL, P.J.; STEWART JR., A.N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2006.

YUN, M.S.; YOGO, Y.; MIURA, R.; YAMASUE, Y.; FISCHER, A.J. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and –susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 83, p. 104-109, 2005.

3 CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Chloris polydactyla* AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

O objetivo desse trabalho foi verificar se falhas no controle da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla* (L) Sw.) quando expostos à aplicação do herbicida glyphosate eram devido a falhas na aplicação ou um possível caso de resistência. Para este fim, foram coletadas 87 populações dos estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Para melhor organização dos dados, o trabalho foi dividido em quatro etapas. Na primeira etapa, os biótipos foram semeados em casa-de-vegetação em cinco repetições, onde quatro foram submetidas à dose de 960 g e.a. ha^{-1} de glyphosate e uma foi deixada para classificação junto ao herbário ESA e coleta de sementes para o plantio da “geração F1”, denominada esta etapa de "experimento screening". Os biótipos sobreviventes foram selecionados para a segunda etapa do trabalho através de notas visuais de controle, juntamente com 15 biótipos que foram eficientemente controlados pelo glyphosate (biótipos suscetíveis), para a estimativa da dose base de controle (Baseline Herbicide Sensitivity - BHS), uma vez que não existe recomendação oficial do ingrediente ativo glyphosate para o controle específico da espécie *Chloris polydactyla*. Na segunda etapa, foram semeados os biótipos sobreviventes com outros 15 biótipos suscetíveis para a realização de curvas de dose-resposta com dez tratamentos e quatro repetições, com doses variando de 0 a 1800 g e. a. ha^{-1} de glyphosate, sendo esta denominada "geração F1". Da geração F1, foram obtidas as doses necessárias para reduzir o crescimento das plantas em 80% baseados no controle visual (GR_{80}) e fitomassa seca (LD_{80}), da qual seria a dose de recomendação estimada. Após o fim da segunda etapa, foram coletadas sementes da geração F1 e ressemeados os biótipos para a confirmação da herdabilidade das características genéticas que conferem resistência, sendo denominada "geração F2", com a mesma metodologia de dose-resposta da segunda etapa. Por fim, a quarta etapa comparou os biótipos com suspeita de resistência com aqueles suscetíveis através da obtenção de seu fator de resistência (GR_{50r}/GR_{50s}). Os resultados foram os seguintes: a primeira etapa resultou que apenas dois biótipos dos 87 estudados sobreviveram à aplicação do glyphosate na dose de 960 g e.a. ha^{-1}, que foram os biótipos de número 59 e 69, com controle visual de 60% para ambos. A segunda e terceira etapas mostraram, por meio da GR_{80} e LD_{80} do biótipo 59 e 69, que a dose ideal de controle do capim-branco é de 705,41 g e.a. ha^{-1} de glyphosate. Por fim, comparando-se os biótipos resistentes com os suscetíveis por meio da GR_{50}, foram obtidos fatores de resistência (GR_{50r}/GR_{50s} e LD_{50r}/LD_{50s}) que variaram entre 3,92 e 7,95, confirmando a resistência dos dois biótipos estudados.

Palavras-chave: Capim-branco; Biótipos resistentes; Curva de dose-resposta

Abstract

This study aimed to determine whether failure to control the weed Tall windmill grass (*Chloris polydactyla* (L) Sw.) when exposed to the herbicide glyphosate, were due to failures in the application or a possible new case of glyphosate-resistance. To this end, 87 populations from Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo and Paraná were collected in field. To better data organization, the research has been subdivided into four steps, as follows. In the first step, the biotypes have been sown in greenhouse conditions and five replications, where four were exposed to a dose of 960 g ae ha^{-1} of glyphosate and the fifth was used to confirm the species at the ESA herbarium and collection of seeds for planting the "F1 generation". This first step was designated as "screening”. The biotypes which survived, based on visual rates, have been selected for the second step, along with 15 biotypes which were effectively

controlled by glyphosate (susceptible biotypes), to estimate the baseline herbicide sensitivity (BHS), since there is no official recommendation of glyphosate to control this specific species. In the second step, the biotypes selected have been sown for dose-response experiment, with ten treatments and four replications, with doses ranging from 0 to 1800 g a.e ha^{-1} of glyphosate, which was designated as "F1 generation". The effective rate GR_{80} and LD_{80} were used from “generation F1” to estimate the labeled rate. Seeds from F1 generation were collected for a new dose-response experiment, to confirm the heritability of genetic traits that confers resistance, designated as "F2 generation", as the third step. The fourth step compared the supposed resistant biotypes with those susceptible by obtaining its resistance factor (GR_{50r}/GR_{50s} and LD_{50r}/LD_{50s}). The results were as follows: the first step resulted in only two survivers biotypes out of the 87 biotypes studied, at 960 g a.e. ha^{-1} of glyphosate, which the biotypes numbers were 59 and 69, with visual control of 60% for both. The second and third stages showed, based on the GR_{80} and LD_{80}, that the effective rate for control *Chloris polydactyla* is 705.41 g a.e. ha^{-1} of glyphosate. Finally, by comparing the biotypes 59 and 69 to a susceptible one, the resistance factors ranged between 3.92 and 7.95, by all means confirming the resistance of *Chloris polydactyla* to glyphosate.

Keywords: Tall windmill grass; Glyphosate-resistant biotypes; Dose-response experiment

3.1 Introdução

A resistência de plantas daninhas a herbicidas está entre as principais preocupações na agricultura moderna na área da ciência das plantas daninhas. A resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate é um exemplo que ilustra bem a situação atual do manejo de plantas daninhas nos sistemas agrícolas ao redor do mundo. Este herbicida vem sendo usado na agricultura em todo o mundo por mais de 40 anos e hoje é o herbicida mais comercializado no globo. No mundo, foram identificados 28 espécies de plantas resistentes a este herbicida até o momento, em 25 diferentes países (HEAP, 2014). A diagnose rápida e precisa da resistência é essencial para o manejo das populações selecionadas, principalmente àquelas que nenhum ou poucos casos de resistência tem sido relatados na literatura.

Apesar de já existirem relatos de possíveis casos de resistência do capim-branco (*Chloris polydactyla*) ao glyphosate (BRUNHARO et al., 2012; PLÁCIDO et al., 2013), pesquisas mais detalhadas devem ser realizadas para verificar se os casos relatados são devido a, por exemplo, diferenças naturais de suscetibilidade ao glyphosate por diferenças regionais, e estipular uma dose base de controle baseada em biótipos suscetíveis dessa espécie, uma vez que não existe recomendação oficial para a utilização desse herbicida para o controle do capim-branco (BURGOS et al., 2013).

O herbicida glyphosate é o produto químico mais usado para a eliminação de plantas daninhas no mundo devido, principalmente, à introdução e vasta expansão das plantas

geneticamente modificadas para a resistência a esse produto (DILL; CAJACOB; PADGETTE, 2008). Há cerca de quinze anos atrás, mais especificamente antes da ampla adoção de culturas geneticamente modificadas para a resistência a herbicidas, não havia plantas daninhas resistentes ao glyphosate, apesar de naquela época (meados dos anos 90) este herbicida já completava vinte anos de mercado (DYER, 1994). Este herbicida atua inibindo a EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, E.C. 2.5.1.19), enzima esta que atua na rota do ácido chiquímico, responsável pela ligação do chiquimato-3-fosfato com o fosfoenolpiruvato que resultará na molécula EPSP e fosfato inorgânico. Por esta inibição, a biossíntese de aminoácidos aromáticos, lignina, flavonas, isoflavonas, antocianina e muitos outros compostos secundários indispensáveis para a planta é comprometida, levando a planta à morte (RIPPERT et al., 2004; TAIZ; ZAIGER, 2009). A EPSPs, segundo Velini et al. (2012) possui elevado nível de conservação, ou seja, ela está presente em grande parte dos vegetais de uma forma estável/pouco mutada nas regiões em que o herbicida atua, característica esta que confere ao glyphosate amplo espectro de ação sobre os vegetais e pouca seletividade.

Segundo a WSSA - Weed Science Society of America – (1998), para uma planta daninha ser considerada resistente, é necessário que ela atenda a cinco critérios pré-estabelecidos, a seguir:

a) Atender a definição de planta daninha resistente: resistência de plantas daninhas a herbicidas é “a habilidade inerente de um biótipo sobreviver e se reproduzir após a exposição a uma dose de herbicida normalmente letal a um biótipo selvagem da mesma espécie”. Por essa definição, fica claro que a resistência de plantas daninhas a herbicidas pode ocorrer naturalmente ou induzida por técnicas como engenharia genética ou seleção de variantes produzidos por meio de técnicas de cultura de tecidos ou mutagênese. Entretanto, pela definição acima, as culturas geneticamente modificadas podem ser inclusas no grupo de plantas resistentes a herbicida. Diante disso, Heap e Lebaron (2001) complementaram a definição da seguinte maneira: “Planta daninha resistente é aquela que anteriormente era considerada suscetível e ‘desenvolveu’ a capacidade de sobreviver a uma dose recomendada de herbicida e consegue completar seu ciclo”. A palavra “desenvolveu” nesta definição é usada no sentido de que as plantas daninhas não desenvolvem a capacidade, e sim são selecionadas pelo herbicida, de forma que o biótipo resistente sempre existiu na população, entretanto em baixa frequência.

b) Dados para a confirmação da resistência: a confirmação da resistência de um biótipo deve ser feita por um cientista ou um grupo idôneo, por meio da comparação de um biótipo supostamente resistente com um biótipo sabidamente suscetível da mesma espécie, através da coleta de dados com repetições e análise estatística.

c) A resistência deve ser herdável: partindo do conceito de que a resistência se dá por meio de biótipos selecionados previamente em uma população, e que esses biótipos possuem a capacidade de sobreviver à exposição de uma dose letal de herbicida por possuírem características genéticas em seu DNA que dão tal habilidade, é imprescindível que essas características genéticas sejam herdáveis para as próximas gerações. Esse critério de confirmação é atendido por meio de repetição do experimento com as partes reprodutivas do biótipo a princípio utilizado. Por exemplo: houve um escape no campo, e essas plantas foram coletadas para serem submetidas a um experimento de dose-resposta em casa de vegetação, em ambiente controlado. Ao final do experimento, seria ideal que algumas plantas sejam deixadas para produzir sementes, estas coletadas e o experimento repetido.

d) Definição prática de resistência: a WSSA considera que para uma planta daninha ser considerada resistente, é necessária a combinação entre a definição científica e a definição agronômica de ambas. A definição científica não leva em consideração a dose recomendada do herbicida, pois, embora dois biótipos possam ser estatisticamente diferentes quanto à resposta ao herbicida, isso não necessariamente implica que o herbicida não controla a resistente na dose recomendada de campo. Por outro lado, a definição agronômica sugere que o biótipo, para ser considerado resistente, deva sobreviver à dose recomendada em condições normais de campo. Se a planta daninha em questão atender apenas à definição da resistência científica, a WSSA considera que este caso pode ser um caso de suscetibilidade diferencial de biótipos sem consequências práticas. Portanto, é necessário que a planta daninha em questão cause um impacto prático no campo, quando sobreviver à dose recomendada.

Na última década, diversos métodos de detecção de resistência foram elaborados, assim como a base de dados se expandiu mundialmente e se tornou facilmente acessível, da mesma forma como o compartilhamento de conhecimentos como confirmação da resistência, avaliação do nível de resistência e distribuição geográfica desses biótipos-problema.

Burgos et al. (2013) apresentaram uma revisão sobre testes para a confirmação de resistência de vários grupos de herbicidas a várias espécies. Dentre os diversos citados, a realização de curvas de dose-resposta é o método mais utilizado na comunidade científica (NANDULA et al., 2007; RITZ, 2010; RITZ et al., 2006; CARVALHO et al., 2011; NORSWORTHY et al., 2011b; ALARCÓN-REVERTE et al., 2013; HERBICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - HRAC, 2014). Esta técnica, quando aplicada para a confirmação de resistência de biótipos a herbicidas, se baseia na comparação estatística da dose que proporciona um determinado controle da planta daninha (estabelecido pelo pesquisador) e de uma população conhecidamente suscetível com biótipos dos quais há a desconfiança de que sejam resistentes. Segundo Burgos et al. (2013), quando estuda-se um possível caso de resistência pela primeira vez, a utilização da metodologia de curvas de dose-resposta continua sendo a mais indicada.

A diagnose acurada e rápida da resistência de plantas daninhas a herbicidas é crucial para o manejo e mitigação em um sistema de produção. Ainda, um monitoramento detalhado das mudanças na flora infestante é crucial para evitar perdas em vários aspectos por parte do produtor. A partir do conhecimento sobre a presença de plantas infestantes resistentes a herbicidas ou não na área é possível desenhar protocolos de manejo mais apropriado (JOHNSON et al., 2009).

A planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla* (L.) Sw.) é uma planta daninha nativa do continente americano e se distribui amplamente desde o sul do Chile até o sul dos Estados Unidos da América do Norte. Esta planta, de ciclo C4, pode ser encontrada em estágio de florescimento durante o ano todo e suas sementes possuem consistência aveludada, característica que ajuda em sua dispersão pelo vento. Segundo Lorenzi (2008), a planta daninha está presente em alta frequência no Brasil, nas regiões Norte e Centro-Oeste, considerada medianamente frequente e dominante de beiras de estradas, pastagens e pomares. O mesmo autor menciona que a planta, até o ano de publicação de seu trabalho, estava chegando a áreas do Paraná. Entretanto, recentemente, tem-se notado a grande dispersão geográfica dessa planta daninha em toda a região sudeste e sul do Brasil, e também pode ser

encontrada em áreas de produção de grãos, pastagens e áreas não-agrícolas do centro-oeste. Segundo Carvalho et al. (2005), a planta daninha capim-branco possui alta produção final de massa seca e alta produção de sementes, características que a torna altamente competidora dos recursos naturais com a cultura de interesse agrícola. Nos últimos anos, relatos de falhas de seu controle pelo herbicida glyphosate por parte de agricultores vem sendo feitos, principalmente em áreas de produção comerciais como lavouras de soja e pomares cítricos. Diante do exposto, fica evidente que a constatação acurada da resistência dessa planta daninha é indispensável para que medidas de manejo eficientes sejam tomadas. Portanto, o objetivo desse trabalho é seguir metodologia de comprovação da resistência do capim-branco ao glyphosate, por meio de experimentos de dose-resposta.

3.2 Material e Métodos

Com o intuito de cumprir todos os critérios estabelecidos pela WSSA (1998) e para melhor organização dos dados, os experimentos relacionados à confirmação da resistência de biótipos de capim-branco ao glyphosate foram divididos em quatro etapas.

3.2.1 Primeira etapa – "Screening" das populações coletadas no campo

As sementes da planta daninha capim-branco foram coletadas em diversas localidades agrícolas em áreas onde o seu controle pelo herbicida glyphosate foi considerado ineficaz (escapes). As coordenadas geográficas da área e a data foram anotados em sacos de papel no momento da coleta e trazidas ao Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP, onde as sementes de cada população foram cadastradas, conforme relatado na Tabela 3.1. Na Figura 3.1 podem ser observados os locais aproximados de coletas no mapa do Brasil, sendo que as 87 amostras foram oriundas dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo.

Cada amostra foi semeada em vasos de plástico com capacidade de 1,0 L, preenchidos com substrato comercial, devidamente e igualmente adubados, com cinco repetições por amostra, as quais posteriormente foram aplicadas quatro unidades e uma deixada até a emissão da panícula para a correta identificação junto ao herbário da ESALQ, e coleta de sementes. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação ao longo de sua condução, com irrigação diária de aproximadamente 4 mm, distribuídos durante o dia. A finalidade desta etapa do experimento foi fazer o "*screening*" de populações possivelmente resistentes, eliminando as populações suscetíveis, ou seja, as populações que nesta etapa mostravam-se

suscetíveis eram eliminadas e as que apresentavam algum grau de resistência eram utilizadas para posterior análise mais detalhada. Para isso, quando 50% + pelo menos uma planta atingiram o estágio vegetativo 23, segundo a escala BBCH (HESS et al., 1997), foi aplicado o herbicida glyphosate, marca comercial Roundup Ready® (Nome químico: N-(phosphonomethyl)glycine, Sal de Isopropilamina de glyphosate 648 g i.a. ha^{-1} ou 480 g e.a. ha^{-1}), na dose equivalente a 2 L ha^{-1} ou 960 g i.a. ha^{-1}. Para a aplicação dos tratamentos foi utilizado um pulverizador costal, trabalhando a uma pressão constante de 2,0 bar e pressurizado com CO_2, equipado com ponta do tipo leque Teejet XR 110.02, onde os cálculos da quantidade de herbicida foram baseados em um volume de calda correspondente a 200 L ha^{-1}, calibrados a altura de 0,50 m acima do alvo. As avaliações foram realizadas semanalmente, até 35 dias após a aplicação. Esse período de avaliação mais extenso que o comumente adotado de 28 dias foi definido devido ao capim-branco apresentar sintomas muito lentamente após a aplicação do glyphosate. Após esse período, foram anotadas as populações que sobreviveram e as que não sobreviveram, da qual foi considerada sobrevivente aquela população que obteve controle visual menor que 80% comparado a uma testemunha sem aplicação de herbicida (vaso deixado para identificação e coleta de sementes), segundo escala da Asociсión Latino Americana de Malezas, (ALAM, 1974), detalhada na Tabela 3.2.

Tabela 3.1 – Amostras coletadas em campos com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate. Piracicaba, 2013-2014

(continua)

Amostra	Município	Estado	Data de Coleta	Latitude	Longitude
1	Amambaí	MS	7/1/2013	22°96'64"	55°05'96"
2	Amambaí	MS	7/1/2013	22°97'24"	55°01'727"
3	Antonio João	MS	14/01/2013	22°10'67"	56°02'059"
4	Aral Moreira	MS	10/1/2013	22°91'86"	55°41'444"
5	Aral Moreira	MS	10/1/2013	23°01'17"	55°60'068"
6	Laguna Carapã	MS	2/1/2013	22°62'34"	55°40'15.7"
7	Ponta Porã	MS	2/1/2013	22°64'63"	55°51'56.4"
8	Ponta Porã	MS	2/1/2013	22°48'37"	55°60'9"
9	Sete Quedas	MS	19/12/2012	23°76'5"	54°88'22"
10	Aral Moreira	MS	10/1/2013	23°00'57"	55°45'23"
11	Laguna Carapã	MS	20/12/2012	22°95'69"	55°49'04"
12	Tacuru	MS	3/2/2013	23°54'43"	55°03'1.11"
13	Aral Moreira	MS	10/1/2013	22°97'27"	55°33'4,69"
14	Ponta Porã	MS	4/1/2013	22°76'86"	55°41'0,93"
15	Amambaí	MS	9/1/2013	22°99'58"	55°22'179"
16	Amambaí	MS	8/1/2013	23°09'08"	55°15'8,53"
17	Aral Moreira	MS	14/01/2013	22°97'97"	55°35'93"
18	Tacuru	MS	3/1/2013	23°69'92"	55°06'86"
19	Laguna Carapã	MS	2/1/2013	22°61'85"	55°34'87.2"
20	Tacuru	MS	3/1/2013	23°62'81'	54°82'022"
21	Laguna Carapã	MS	3/1/2013	22°61'84"	55°23'491"
22	Aral Moreira	MS	10/1/2013	22°90'78"	55°44'525"
23	Laguna Carapã	MS	4/1/2013	22°57'98"	55°12'953"
24	Goioerê	PR	8/2/2013	24°07'59,2"	53°03'24.4"
25	Amambaí	MS	8/1/2013	23°17'86	55°35'17"
26	Amambaí	MS	8/1/2013	23°28'63"	55°27'002"

Tabela 3.1 – Amostras coletadas em campos com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate. Piracicaba, 2013-2014

(continuação)

Amostra	Município	Estado	Data de Coleta	Latitude	Longitude
27	Amambaí	MS	8/1/2013	23°26'77"	55°29'8,64"
28	Amambaí	MS	7/1/2013	23°13'73"	55°22'5,65"
29	Ponta Porã	MS	4/1/2013	22°45'64"	55°44'9,88"
30	Amambaí	MS	8/1/2013	23°15'86"	55°23'4,72"
31	Aral Moreira	MS	15/01/2013	23°26'77"	55°29'8,64"
32	São Miguel do Iguaçu	PR	14/12/2012	25°22’3,36'	54°11’4,97’'
33	Peabiru	PR	6/12/2012	23°52°'59"	52°23'24"
34	Campo Mourão	PR	6/12/2012	24°02'42"	52°27'55"
35	Catanduvas	PR	19/12/2012	25°21'45,1"	53°18'09,4"
36	Lindoeste	PR	17/12/2012	25°12' 11,8"	53°34'47,7"
37	Corbélia	PR	18/12/2012	24°54'49,5"	53°11'40,6"
38	Lindoeste	PR	17/12/2012	25°12'04,4"	53°33'51,5"
39	Cascavel	PR	17/12/2012	24°45'49,6"	53°08'44,6"
40	Braganey	PR	16/12/2012	24°48'59,6"	53°10'31,9"
41	Santo Izidoro	PR	10/12/2012	25°31'12"	53°14'16,3"
42	Santa Lucia	PR	6/12/2012	25°21'23,7"	53°33'15,5"
43	Catanduvas	PR	5/12/2012	25°07'44,3"	53°08'22,5"
44	Cascavel	PR	19/12/2012	24°57'50,6"	53°23'54,7"
45	São João D'Oeste	PR	18/12/2012	24°58'36,4"	53°15'57,7"
46	Caarapó	MS	18/12/2013	22°37'38,77"	54°48'22,71"
47	Missal	PR	18/12/2012	25°18’35,11'	54°14’79,22’'
48	Diamante Do Oeste	PR	4/12/2012	25°04’2,25'	54°12.0,47"
49	Campo Bonito	PR	5/12/2012	25°21'21,7"	53°03'13,5"
50	Campo Bonito	PR	5/12/2012	25°02'15,5"	53°02'38,1"
51	Campo Bonito	PR	5/12/2012	25°59'20,0"	53°03'26,4"
52	Campo Bonito	PR	5/12/2012	25°03'56,7"	53°00'46,1"

Tabela 3.1 – Amostras coletadas em campos com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate. Piracicaba, 2013-2014

(continuação)

Amostra	Município	Estado	Data de Coleta	Latitude	Longitude
53	Quedas do Iguaçú	PR	22/11/2012	25°26'27,8"	52°55'22,3"
54	Catanduvas	PR	22/11/2012	25°20'37,7"	53°10'21,2"
55	Cascavel	PR	22/11/2012	25°03'48,4"	53°13'13,8"
56	Lindoeste	PR	17/12/2012	25°12'08,5"	53°34'13,3"
57	Quedas do Iguaçú	PR	21/11/2012	25°27'08,7"	52°26'14,6"
58	Cascavel	PR	22/11/2012	24°59'00,4"	53°21'52,2"
59	Mamboré	PR	16/01/2013	24°19'55"	52°39'55"
60	Formosa Do Oeste	PR	20/01/2013	24°17'38,48"	53°19'30,59"
61	Ouro Verde Do Oeste	PR	23/01/2013	24°44'28,15"	53°57'34,15"
62	Quatro Pontes	PR	11/1/2013	24°33'40,81"	53°58'54,45"
63	Pato Bragado	PR	11/1/2013	24°39'04,69"	54°14'18,34"
64	Iguiporã	PR	28/01/2013	24°31'5,22"	54°11'3,23"
65	Santa Tereza do Oeste	PR	4/12/2012	25°04'57,2"	53°37'21,1"
66	Braganey	PR	16/12/2012	24°45'55,6"	53°06'14,9"
67	Braganey	PR	16/12/2012	24°45'49,6"	53°08'44,6"
68	Braganey	PR	16/12/2012	24°50'36"	53°08'40,2"
69	Matão	SP	18/01/2012	21°37'06,21	48°29'27,36
70	Braganey	PR	18/12/2012	24°49'52,4"	53°07'56,1"
71	Cascavel	PR	7/01/2013	24°53'55,9"	53°21'28,6"
72	Iguatu	PR	7/1/2013	24°42'45,5"	53°01'0,24"
73	Iguatu	PR	7/1/2013	24°42'45"	53°03'16,4"
74	Corbélia	PR	10/1/2013	24°46'36,4"	53°18'32,5"
75	Corbélia	PR	24/01/2013	24°48'05,1"	53°15'50,1"
76	Corbélia	PR	24/01/2013	24°49'37,3"	53°12'35,6"
77	Corbélia	PR	24/01/2013	24°48'57,6"	53°12'12,9"
78	Corbélia	PR	24/01/2013	24°45'59,7"	53°10'58,1"

Tabela 3.1 – Amostras coletadas em campos com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate. Piracicaba, 2013-2014

(conclusão)

Amostra	Município	Estado	Data de Coleta	Latitude	Longitude
79	Uberaba	MG	30/01/2013	19°48'57,05"	47°48'56.28"
80	Porto Ferreira	SP	30/01/2013	21°55'46,58"	47°28'47,77"
81	Guará	SP	30/01/2013	20°27'10,74"	47°49'14,43"
82	Araras	SP	30/01/2013	22°25'00,10"	47°20'24,87"
83	Aramina	SP	30/01/2013	20°06'52,03"	47°46'06,43"
84	Cravinhos	SP	30/01/2013	21°21'56,70"	47°47'01,88"
85	Ituverava	SP	30/01/2013	20°21'42,24"	47°42'11,32"
86	Uberaba	MG	30/01/2013	19°49'13,02"	47°59'51,11"
87	Piracicaba	SP	22/02/2013	22°42'31,45"	47°37'40,50"

Notas: *Controle Visual, do qual varia de 0 (ausência de sintomas visuais) a 100% (morte completa da planta).

Figura 3.1 - Parte do mapa geográfico do Brasil que ilustra a localização aproximada do local de coleta das populações estudadas. Piracicaba, 2013-2014

Tabela 3.2 – Escala de avaliação visual de controle de plantas daninhas proposta pela Asociación Latino Americana de Malezas, ALAM (1974)

Porcentagem de controle (%)	Descrição do nível de controle
0-40	Pobre
41-60	Regular
61-70	Suficiente
71-80	Bom
81-90	Muito bom
91-100	Excelente

Fonte: Adaptado de ALAM (1974)

As populações que sobreviveram foram selecionadas para o estudo posterior, bem como algumas populações que tiveram controle efetivo pelo glyphosate. O motivo pelo qual

foram selecionadas populações consideradas suscetíveis é por não existir, até o momento, recomendação específica para a espécie de capim-branco, apenas para o gênero *Chloris spp.* como *Chloris retusa* e *Chloris pycnothrix.* Para o controle eficiente para essas últimas espécies, são sugeridas doses que variam entre 460 a 960 g i.a. ha^{-1}. Por esse motivo, foram selecionadas 15 populações que foram controladas eficientemente pelo glyphosate com a dose mais alta encontrada nas recomendações desse gênero (960 g e.a. ha^{-1}) e mais duas que não foram bem controladas, uma vez que apenas duas de todas as 87 populações estudadas não tiveram controle efetivo quando expostas ao glyphosate. Essa seleção de populações foi realizada para se obter uma dose de controle específica para essa espécie, conhecido do inglês como "baseline herbicide sensitivity" (BHS) (BURGOS et al., 2013).

O critério para a escolha das populações suscetíveis foi por meio de observações, com diferenças nítidas de crescimento, ao mesmo tempo em que houve suscetibilidade ao glyphosate, quantidade de sementes coletadas para facilitar um posterior estudo mais detalhado ou mesmo proximidade geográfica com a população que não obteve controle satisfatório, conforme recomendações de Burgos et al. (2013).

3.2.2 Segunda etapa – Curvas de dose resposta ao glyphosate

As populações selecionadas na primeira etapa foram semeadas em vasos com capacidade para 1,0 L, em substrato comercial, devidamente e igualmente adubados, na quantia de 50 vasos por população. Esse conjunto de biótipos foi designado como "geração F1", por ser proveniente da coleta de sementes da etapa de *screening*. Cada população foi submetida a dez tratamentos com quatro repetições, totalizando quarenta vasos, portanto foram semeados dez vasos extras para facilitar a homogeneidade do estádio de crescimento no momento da aplicação e garantir o número suficiente de plantas. Os vasos restantes foram deixados junto com a testemunha sem aplicação, com a finalidade de produção de sementes e repetição desse experimento, para que o critério de herdabilidade fosse satisfeito (CHRISTOFFOLETI; LOPEZ-OVEJERO, 2008). Nesta etapa, foram deixadas apenas três plantas por vaso por meio de desbaste a partir de um número maior de *seedlings*.

Os tratamentos com o herbicida glyphosate foram realizados quando as plantas de capim-branco estavam no estádio vegetativo 23, segundo a escala de BBCH (HESS et al., 1997), e para isso foi utilizado um pulverizador costal, trabalhando a uma pressão constante de 2,0 bar e pressurizado com CO_2, equipado com ponta do tipo leque Teejet XR 110.02, com um volume de calda correspondente a 200 L ha^{-1}. O delineamento experimental foi em blocos

inteiramente casualizados com quatro repetições e dez tratamentos. A seguir, na Tabela 3.3, os tratamentos com o herbicida glyphosate utilizados para todas as populações estão descritos.

Tabela 3.3 – Lista dos tratamentos utilizados para o experimento de curvas de dose-resposta para as populações selecionadas a partir da primeira etapa. Piracicaba, 2013-2014

Tratamentos	**L ha^{-1}***	**g e.a. ha^{-1}****
1	0	0
2	0,1875	90
3	0,375	180
4	0,75	360
5	1,125	540
6	1,5	720
7	1,875	900
8	2,25	1080
9	3,0	1440
10	3,75	1800

*Produto comercial: Roundup Ready®, em litros por hectare. **Gramas de equivalente ácido por hectare.

As avaliações constaram de notas visuais de controle (ALAM, 1974), semanalmente, até 35 dias após a aplicação dos tratamentos, quando foi realizada a coleta do material remanescente para a avaliação da fitomassa seca da parte aérea. O material vegetal remanescente nos vasos foi coletado com a ajuda de uma tesoura de poda, cortando-se rente ao solo as três plantas de cada vaso, alocados em sacos de papel devidamente identificados e levados para uma estufa de secagem de circulação forçada por 72 horas a uma temperatura de 75°C. Após a secagem do material vegetal, o mesmo teve sua massa mensurada através de uma balança de precisão de duas unidades decimais.

A análise estatística inicial foi realizada através do software SAS, onde foi analisada a normalidade dos resíduos e homogeneidade da variância. Segundo recomendações de Burgos et al. (2013), se a homogeneidade de variâncias não for significativa, a utilização de regressões seria comprometida e outra metodologia teria que ser utilizada. Em seguida, foi utilizado o pacote “drc” do software estatístico R (RITZ; STREIBIG, 2005) para as análises das regressões não-lineares do tipo log-logística. A partir deste, os dados de controle visual aos 35 dias após a aplicação e os dados de fitomassa seca foram ajustados ao modelo log-logístico citado por Knezevic et al. (2007), que possui a seguinte equação (Equação 3.1) de regressão não-linear:

$$Y = \frac{d}{1 + \exp[b(\log x - loge)]} \quad (3.1)$$

Onde “Y” é a variável avaliada; “x” é a dose do herbicida utilizada; “b” é a declividade da curva ao entorno de “e”, “d” é o limite superior da curva e “e” corresponde à dose que proporciona 50% de resposta da variável. Neste caso, o limite inferior é zero, levando a regressão a três parâmetros.

Em seguida, foram analisados os resultados obtidos a partir do software R no que se refere ao cálculo da quantidade de herbicida necessária para reduzir o crescimento a partir de avaliação visual da planta em 50%, 80% e 95% (também conhecida como GR_{50}, GR_{80} e GR_{95} – Growth Reduction) bem como a quantidade de herbicida necessária para “matar” 50%, 80% e 95% da planta com base na fitomassa seca (também conhecida como LD_{50}, LD_{80} e LD_{95} – Letal Dose) e seus respectivos erros padrões. Essas estimativas são importantes quando se estuda a suscetibilidade de plantas daninhas a herbicidas, pois é uma maneira de transformar observações biológicas em números, facilitando sua compreensão e interpretação. Além do mais, foi também determinada a dose de controle para a planta daninha capim-branco (BHS), que foi obtida através das GR_{80} e LD_{80} das populações consideradas suscetíveis.

3.2.3 Terceira etapa – Caracterização da dose de controle do capim branco (BHS)

Para a próxima etapa do trabalho, foram colhidas as sementes da geração F1, provindas dos vasos extras que não foram utilizados para o experimento de dose-resposta e semeadas novamente, sendo denominadas de “geração F2”. Toda a metodologia aplicada na segunda etapa do trabalho foi refeita, com a finalidade de atender ao critério de herdabilidade, caso por fim alguma das populações fosse considerada resistente. Novamente, foi determinada a BHS de controle para a planta daninha capim-branco da “geração F2”, que foi obtida através das GR_{80} e LD_{80} das populações consideradas suscetíveis.

3.2.4 Quarta etapa – Determinação do fator de resistência

Como último passo da comprovação de resistência, foram comparadas as populações escapes com uma população selecionada para “representar” as populações suscetíveis.

Após a definição da BHS (GR_{80} e LD_{80} – controle mínimo para ser considerado satisfatório no campo) a população escolhida para representar as suscetíveis e as populações que foram consideradas como resistentes, tiveram seus GR_{50} e LD_{50} comparados (fator de

resistência). O fator de resistência (GR_{50r}/GR_{50s} e LD_{50r}/LD_{50s}) expressa o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% da população resistente é superior à dose que controla 50% da população suscetível (HALL et al., 1998). As comparações entre populações a partir do GR_{80}, LD_{80} e GR_{90}, LD_{80} também são comumente usadas e foram usadas nesse experimento, contudo Seefeldt et al. (1995) não as recomendam isoladamente, por terem suas estimativas e erros maiores que o GR_{50} e LD_{50}, onde este é o método mais exato para estimar suscetibilidade de plantas a herbicidas, segundo os autores.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Primeira etapa – "Screening" das populações coletadas no campo

As notas visuais obtidas aos 35 dias após a aplicação do glyphosate para a realização do *screening* podem ser visualizadas na Tabela 3.4. A escolha do nível de controle acima de 80% para ser considerado como planta controlada não foi feita totalmente com base na escala da ALAM (1974), onde, se baseado nessa escala, 61% de controle seria considerado um controle satisfatório, da qual essa porcentagem permitiria a algumas plantas daninhas se reproduzir e dispersar suas sementes, fato este indesejado na maioria das situações normais de campo. A partir dessa Tabela, é possível concluir que com a dose discriminatória de 960 g e.a. ha^{-1} foi possível ter um controle visual superior a 80% na maioria das populações coletadas para análise de resistência. Entretanto, as populações de Mamboré (PR) e de Matão (SP) tiveram controle visual ambas de 60%, o que provavelmente permitiria a essas plantas continuar seu desenvolvimento e produção de propágulos.

Tabela 3.4 – Resultados do *screening* das amostras recebidas para avaliação da resistência ao glyphosate. Piracicaba, 2013 – 2014

Amostra	Município	Controle*	Amostra	Município	Controle	Amostra	Município	Controle
1	Amambai	100	30	Amambai	100	59**	Mamboré	60
2	Amambai	100	31	Aral Morreira	100	60	Formosa Do Oeste	100
3	Antonio João	100	32	São Miguel do Iguaçu	100	61**	Ouro Verde Do Oeste	90
4	Aral Morreira	100	33	Peabiru	100	62	Quatro Pontes	100
5	Aral Morreira	100	34**	Campo Mourão	100	63	Pato Bragado	90
6	Laguna Carapã	100	35	Catanduvas	100	64	Iguiporã	100
7	Ponta Porã	100	36	Lindoeste	100	65	Santa Tereza do Oeste	100
8	Ponta Porã	100	37	Corbélia	100	66**	Braganey	100
9	Sete Quedas	100	38	Lindoeste	100	67**	Braganey	100
10	Aral Morreira	100	39	Cascavel	100	68**	Braganey	100
11	Laguna Carapã	100	40	Braganey	100	69**	Matão	60
12	Tucuru	100	41	Santo Izidoro	100	70**	Braganey	95
13	Aral Morreira	100	42	Santa Lucia	100	71**	Cascavel	90
14	Ponta Porã	100	43	Catanduvas	100	72	Iguatu	100
15	Amambai	100	44	Cascavel	100	73	Iguatu	100
16	Amambai	100	45	São João D'Oeste	100	74	Corbélia	90
17	Aral Morreira	100	46	Caarapó	100	75	Corbélia	90
18	Tucuru	100	47	Missal	100	76	Corbélia	90
19	Laguna Carapã	100	48	Diamante Do Oeste	100	77	Corbélia	90
20	Tucuru	100	49	Campo Bonito	90	78**	Corbélia	100
21	Laguna Carapã	100	50	Campo Bonito	90	79	Uberaba	100
22	Aral Morreira	100	51	Campo Bonito	90	80**	Porto Ferreira	100
23	Laguna Carapã	100	52	Campo Bonito	90	81**	Guará	100
24	Goioerê	100	53	Quedas do Iguaçú	100	82**	Araras	100
25	Amambai	100	54	Catanduvas	100	83**	Aramina	100
26	Amambai	100	55	Cascavel	90	84**	Cravinhos	100
27	Amambai	100	56	Lindoeste	100	85**	Ituverava	100
28	Amambai	100	57	Quedas do Iguaçú	100	86	Uberaba	100
29	Ponta Porã	100	58	Cascavel	100	87**	Piracicaba	100

Notas: *Controle baseado em avaliação visual, segundo escala da ALAM (ALAM, 1974); ** Populações selecionadas para a próxima etapa do trabalho (etapa 2)

Moreira et al. (2007) estudaram biótipos de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadenses*) com suspeita de resistência ao glyphosate provenientes de pomares cítricos na cidade de Matão-SP. No ano em que os autores realizaram a pesquisa (2006), o histórico de aplicação do herbicida glyphosate datava, segundo os autores, 12 anos. Em pomares de citros do estado de São Paulo, a média anual de aplicações de glyphosate é de três a quatro, com suas doses variando entre 720 e 1440 g e.a. ha^{-1} (PITELLI, 2004; MATHEIS et al., 2006; PINOTTI et al., 2009). Segundo Carvalho e Vargas (2008), a pressão de seleção causada pelo herbicida glyphosate é muito forte sobre as populações de plantas daninhas presentes em áreas de citros, aumentando as chances de que biótipos resistentes sejam selecionados, uma vez que o manejo realizado nessas áreas é muito dependente desse herbicida, seja pela praticidade e amplo espectro de ação que este herbicida possui, seja pela escassez de produtos alternativos, além de sua eficácia e economicidade. Da mesma maneira que Moreira et al. (2007), Melo (2011) e Nicolai et al. (2010) também pesquisaram populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) da região de Matão-SP, provenientes de área de cultivo de citros, e puderam concluir que esses biótipos eram resistentes ao herbicida glyphosate. As populações submetidas a experimentos de dose-resposta estão marcadas com um asterisco na Tabela 3.4.

3.3.2 Segunda etapa – Curvas de dose resposta ao glyphosate da geração F1

A partir da primeira etapa, foram consideradas como suscetíveis 85 populações dentre as 87, e dessas foram escolhidas 15 para ser analisadas e obter-se a BHS, neste caso, considerada como dose que controla tanto visualmente quanto na massa seca pelo menos 80% de seu crescimento.

Os parâmetros obtidos através da regressão não-linear para a avaliação de controle visual estão descritos na Tabela 3.5. É possível perceber a diferença entre as populações que foram consideradas suscetíveis daquelas que foram consideradas resistentes na coluna das GR_{80}. A população número 66, por exemplo, precisou de dez vezes menos herbicida para ser controlada ao mesmo nível (80%) que a população número 69. Entretanto, apenas essa comparação não é suficiente para dizer que uma população é resistente ou não, uma vez que a suscetibilidade natural entre populações de regiões geográficas diferentes é normal, como pode-se comprovar pela Tabela 3.5. Na Tabela 3.5 também estão descritos os parâmetros da curva e outros parâmetros de importância, que são eles:

- “b”: declividade de curva ao entorno de “e”;
- “d”: limite superior da curva, com limite inferior = 0;
- “e” ou “GR_{50}”: quantidade necessária de herbicida necessária para reduzir o crescimento ou “matar” a planta em 50%, comparado com o tratamento testemunha;
- “GR_{80}”: quantidade de herbicida necessária para reduzir o crescimento ou matar a planta em 80%, comparado com o tratamento testemunha (BHS);
- “GR_{95}”: quantidade de herbicida necessária para reduzir o crescimento ou matar a planta em 95%, comparado com o tratamento testemunha.

Entre as populações suscetíveis, a dose necessária para reduzir o crescimento em 80% (BHS) variou entre 111,75 (± 1,47) e 659,33 (± 10,73) g e.a. ha^{-1}, com dose média de 301,66 e desvio padrão de 175,12 g e.a. ha^{-1} de glyphosate quando analisado o controle visual individualmente. Portanto, para controlar o capim-branco, baseado no controle visual, a dose ideal será considerada como a média das GR_{80} dos biótipos suscetíveis + desvio padrão superior desses valores. Portanto, será de 301.66 + 175,12 = 476,78 g e.a. ha^{-1} de glyphosate. O gráfico a seguir (Figura 3.2), representa a frequência de biótipos relacionada com suas respectivas GR_{80}, para melhor ilustração da variabilidade da suscetibilidade das populações.

Tabela 3.5 – Parâmetros da equação não-linear referentes ao controle visual da geração F1 aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos. Piracicaba, 2013 - 2014

	Parâmetros estimados calculados a partir da regressão não-linear* - Controle Visual* **				
Populações	**b****	**d**	**e**	**ED_{80}********	**ED_{95}**********
34	-8.54 ± 1,31	5,02 ± 0,73	103,97 ± 2,37	122,29 ± 5,81	146,77 ± 11,1
59	-2,49 ± 1,42	93,99 ± 15,97	573,64 ± 5,05	1000,4 ± 147,5	1869,3 ± 465,13
61	-2,92 ± 0,49	104,75 ± 2,86	353,84 ± 19,44	568,81 ± 44,19	969,81 ± 152,82
66	-2,79 ± 0,14	100,19 ± 0,21	68,07 ± 1,17	111,75 ± 1,47	195,1 ± 7,51
67	-6,28 ± 0,44	101,29 ± 0,95	528,76 ± 5,82	659,33 ± 10,73	844,95 ± 26,704
68	-2,43 ± 0,23	104,55 ± 2,45	273,55 ± 15,53	483,22 ± 39,23	915,96 ± 121,15
69	-3,59 ± 0,38	91,53 ± 3,96	826,41 ± 30,15	1216 ± 86,54	1876,9 ± 217,58
70	-12,42 ± 4,20	99,46 ± 0,25	150,15 ± 9,23	167,88 ± 4,07	190,32 ± 3,85
71	-3,19 ± 0,54	101,91 ± 2,51	349,98 ± 17,30	540,48 ± 37,75	880,88 ± 126,48
78	-7,80 ± 1,85	98,48 ± 0,53	159,48 ± 4,54	190,49 ± 3,40	232,6 ± 14,72
83	-4,15 ± 0,19	100,53 ± 0,46	204,97 ± 2,28	286,12 ± 6,29	416,26 ± 16,01
82	-10,41 ± 3,63	100,01 ± 0,13	180,87 ± 0,40	206,64 ± 9,99	240 ± 24,18
84	-4,01 ± 0,02	100,26 ± 0,09	127,42 ± 0,33	179,93 ± 0,66	265,18 ± 1,60
81	-6,28 ± 0,44	101,29 ± 0,94	528,76 ± 5,82	659,33 ± 10,73	844,95 ± 26,704
85	-4,84 ± 0,23	98,95 ± 0,53	130,30 ± 2,07	173,51 ± 3,66	239,38 ± 7,99
87	-17 ± 33,99	100,04 ± 1,75	379,76 ± 40,92	412,03 ± 111,46	451,59 ± 204,92
80	-4,10 ± 0,11	100,4±0,31	146,16 ± 1,29	204,86 ± 2,38	299,4 ± 6,14

Notas: *: Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (GR_{50}); ** Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. ***: Controle visual aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos segundo recomendações da ALAM (ALAM, 1974). **** Quantidade necessária de herbicida para reduzir o crescimento em 80% comparado à testemunha não aplicada. ***** Quantidade necessária de herbicida para reduzir o crescimento em 95% comparado à testemunha não aplicada

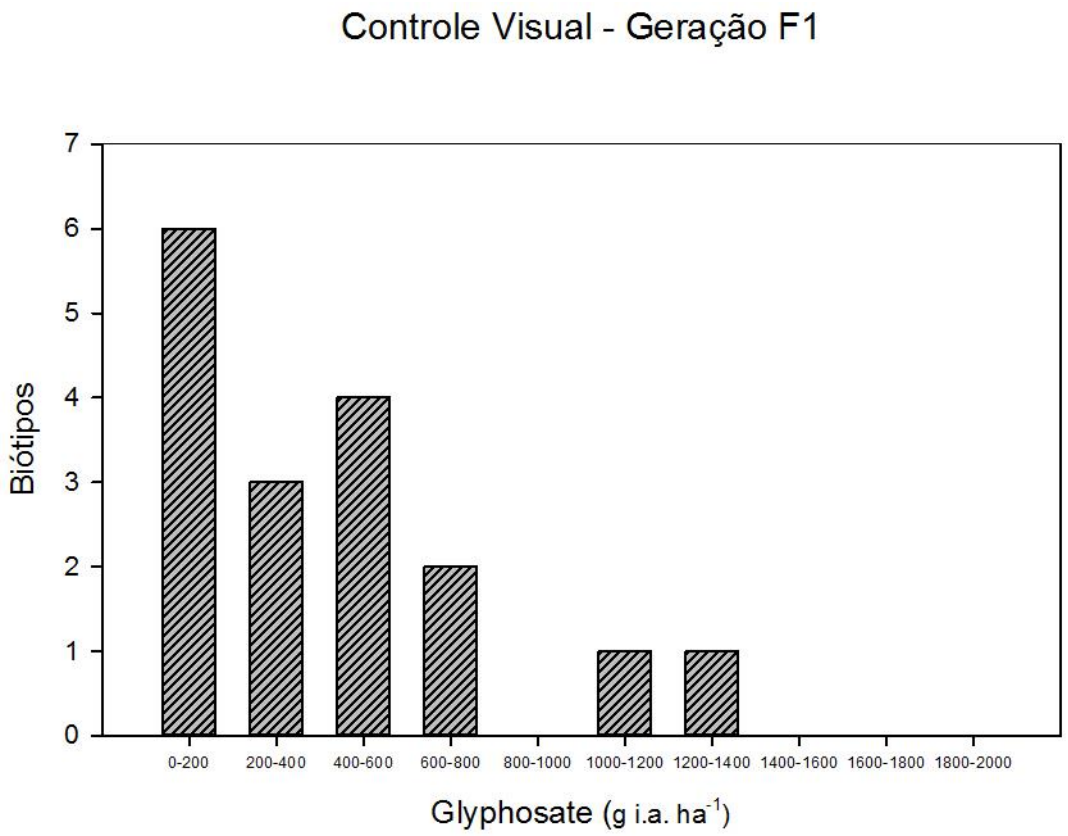

Figura 3.2 – Gráfico da frequência que representa a relação Biótipos X GR_{80}, referente ao controle visual da geração F1. Piracicaba, 2013-2014

Nesse mesmo sentido, a Tabela 3.6 descreve os parâmetros obtidos pela regressão não-linear dos dados de fitomassa seca aos 35 dias após aplicação. A Tabela 3.6 é bastante semelhante à Tabela 3.5 quanto aos resultados dos parâmetros e estimativas, fortificando a veracidade entre dados das avaliações de controle visual e massa seca. Entre as populações suscetíveis, a dose necessária para reduzir o crescimento em 80% (controle satisfatório - BHS) variou entre 143,21 (± 3,15) e 681,05 (± 36,49) g e.a. ha^{-1}, com dose média de 376,37 e desvio padrão de 171,43 g e.a.ha^{-1} para a avaliação de massa seca. Portanto, para controlar o capim-branco, baseado na avaliação de fitomassa seca, a dose ideal será considerada como a média das GR_{80} dos biótipos suscetíveis + desvio padrão superior desses valores. Portanto, será de 376,37 + 171.43 = 547,80 g e.a. ha^{-1} de glyphosate.

Pelas Tabelas 3.5 e 3.6, confirma-se a afirmação de Seefeldt et al. (1995) de que conforme a estimativa se distancia do ponto médio da curva, ou seja, a GR_{50} e LD_{50}, os erros padrões aumentam, aumentando a variabilidade dos dados, com ênfase nas populações que não atingiram controle total (100%), como é o caso das populações número 59 e 69. O gráfico a seguir (Figura 3.3), representa a frequência de biótipos relacionada com suas respectivas

GR_{80}, para melhor ilustração da variabilidade da suscetibilidade das populações baseada na fitomassa seca da geração F1.

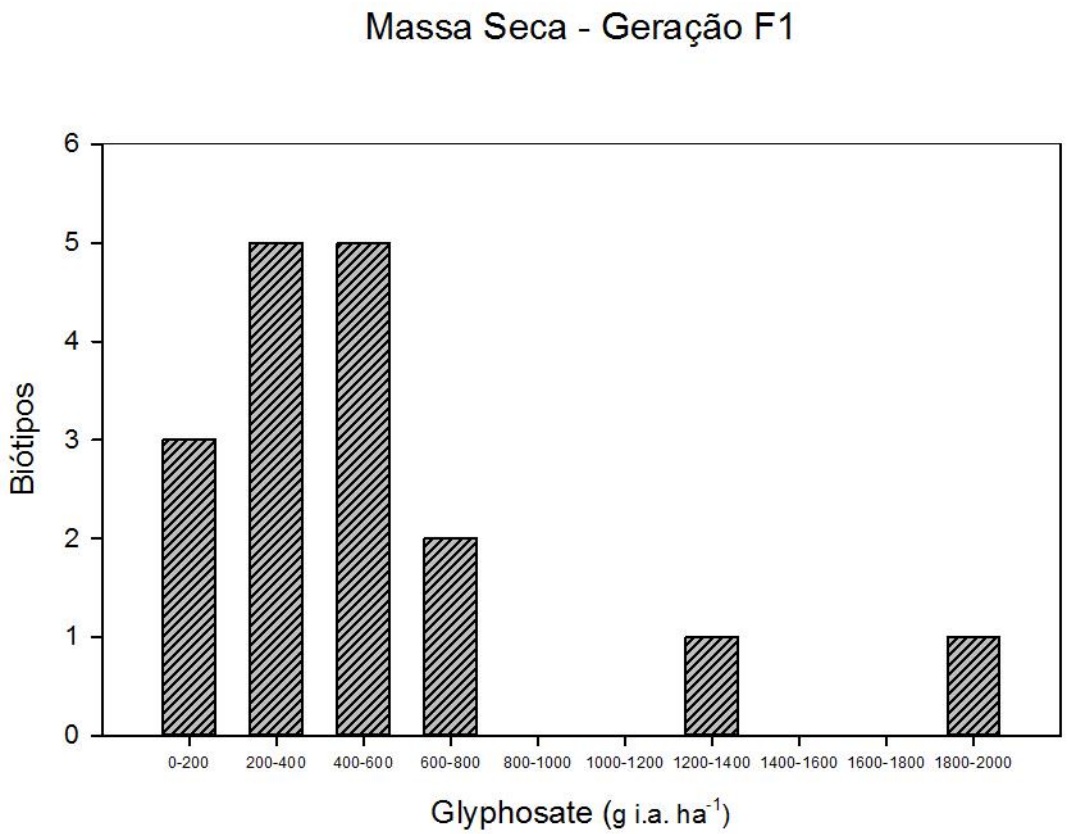

Figura 3.3 – Gráfico da frequência que representa a relação Biótipos X GR_{80}, referente à massa seca da geração F1. Piracicaba, 2013-2014

Tabela 3.6 – Parâmetros da equação referentes à massa seca da geração F1 colhida aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos. Piracicaba, 2013 - 2014

Parâmetros estimados da equação não-linear* - Massa seca***					
Populações	**b****	**d**	**e**	**LD_{80}********	**LD_{95}*********
34	5,02 ± 0,73	22,72 ± 0,68	108,66 ± 4,01	143,21 ± 3,15	195,29 ± 20,46
59	1,42 ± 0,09	15,97 ± 0,28	520,58 ± 29,85	1380,4 ± 76,75	4130,4 ± 469,22
61	2,63 ± 0,24	11,1 ± 0,27	378,62 ± 17,48	641,17 ± 28,37	1159 ± 100,33
66	14,04 ± 26,73	12,58 ± 0,35	164,88 ± 27,64	181,98 ± 4,83	203,34 ± 47,36
67	2,20 ± 0,23	15,21 ± 0,48	363,68 ± 23,68	681,05 ± 36,49	1378,5 ± 149,44
68	2,08 ± 0,18	16,9 ± 0,63	221,99 ± 16,90	431,65 ± 32,17	911,42 ± 107,33
69	1,50 ± 0,19	15,67 ± 0,58	780,76 ± 63,79	1961,5 ± 216,48	5523,8 ± 1246,44
70	15,72 ± 43,56	12,01 ± 0,52	168,23 ± 31,68	183,74 ± 11,18	202,88 ± 67,47
71	1,17 ± 0,12	13,16 ± 0,61	149,38 ± 20,81	484,97 ± 55,72	1821,9 ± 374,61
78	2,52 ± 0,17	16,21 ± 0,34	190,09 ± 6,97	329,13 ± 15,77	610,02 ± 50,82
83	2,44 ± 0,22	10,59 ± 0,30	238,59 ± 12,55	421,07 ± 26,91	797,35 ± 86,40
82	2,72 ± 0,38	13,81 ± 0,48	192,61 ± 11,55	320,14 ± 32,09	566,69 ± 97,80
84	1,23 ± 0,10	6,65 ± 0,21	156,47 ± 13,78	481,85 ± 43,55	1705,9 ± 289,15
81	2,02 ± 0,19	13,43 ± 0,41	161,06 ± 9,32	319,18 ± 26,57	688,51 ± 101,29
85	3,24 ± 0,93	11,09 ± 0,46	141,67 ± 7,84	217,11 ± 30,30	350,79 ± 95,56
87	1,45 ± 0,25	10,48 ± 0,80	220,09 ± 45,28	571,80 ± 80,74	1667,5 ± 405,9
80	2,56 ± 0,43	10,45 ± 0,34	138,86 ± 7,30	238,3 ± 25,42	437,26 ± 88,62

Notas: *: Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (LD_{50}); ** Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. ***: Massa seca mensurada aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos. **** Quantidade necessária de herbicida para diminuir a massa seca em 80% em relação à testemunha não aplicada. *****Quantidade necessária de herbicida para reduzir a massa seca em 95% comparado à testemunha não aplicada.

3.3.3 Terceira etapa – Curva de dose-resposta ao glyphosate da geração F2 e caracterização da dose de controle do capim branco (BHS)

Esta parte do experimento foi feita para comprovar que as características que conferem menor suscetibilidade a certos biótipos é uma característica genética e, portanto, herdável, além de visar atender aos critérios estabelecidos para a confirmação de resistência de plantas daninhas a herbicidas, que se fundamenta na seguinte frase: "Resistência de plantas daninhas é a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, sobreviver após a exposição à dose de um herbicida, que normalmente seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie" (WSSA, 2014).

De maneira geral, os dados das Tabelas 3.7 e 3.8 são bastante semelhantes no que se refere aos dados estimados GR_{50}/LD_{50}, GR_{80}/LD_{80} e GR_{95}/LD_{95}. Entretanto, algumas dessas estimativas são levemente diferentes das anteriores, fato este normal e esperado, pois essa etapa foi realizada em um período diferente do ano, com diferente intensidade de radiação, temperatura e comprimento do dia. Contudo, o padrão apresentado na segunda parte do experimento se manteve nesta terceira parte.

Entre as populações suscetíveis, a dose necessária para reduzir o crescimento em 80% (BHS) variou entre 114,86 (± 2,05) e 675,83 (± 23,70) g e.a. ha^{-1}, com dosagem média de 388,99 e desvio padrão de 162,65 g e.a. ha^{-1} de glyphosate para o controle visual. Portanto, para controlar o capim-branco, baseado na avaliação de controle visual, a dose ideal será considerada como a média das GR_{80} dos biótipos suscetíveis + desvio padrão superior desses valores. Portanto, será de 388,99 + 162,65 = 551,64 g e.a. ha^{-1} de glyphosate. O gráfico a seguir (Figura 3.4), representa a frequência de biótipos relacionada com suas respectivas GR_{80}, baseada no controle visual da geração F2, para melhor ilustração da variabilidade da suscetibilidade das populações.

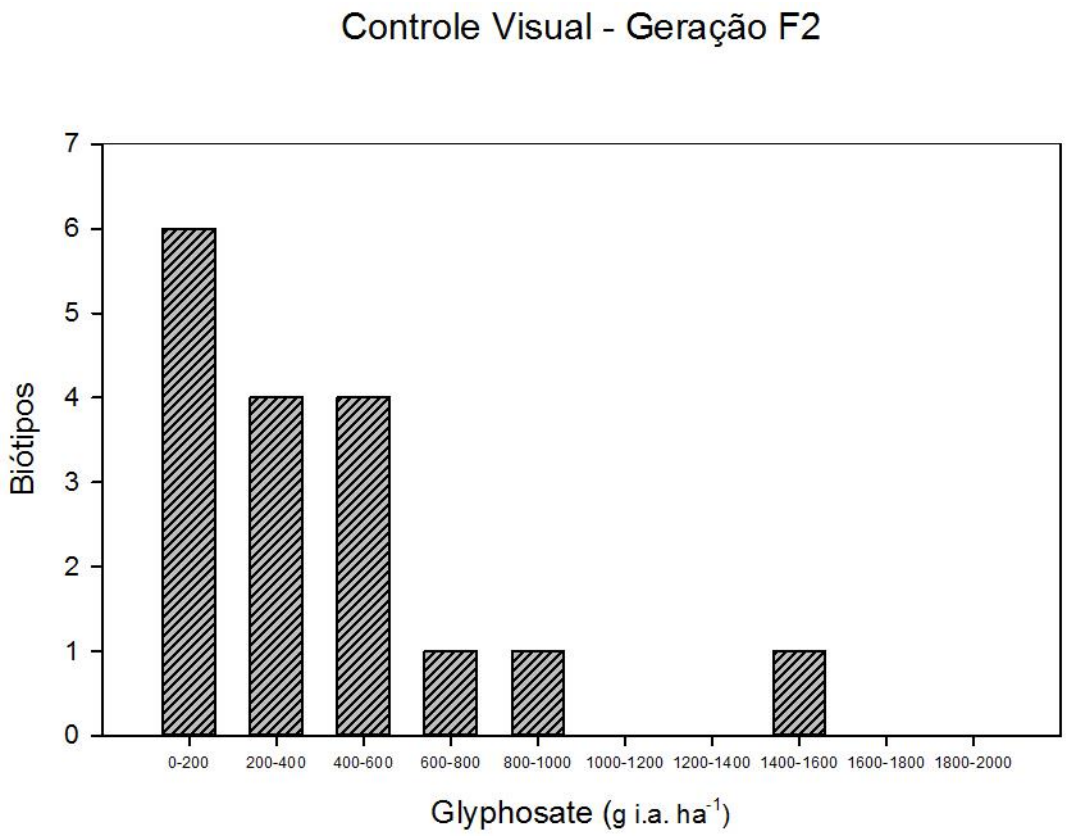

Figura 3.4 – Gráfico da frequência que representa a relação Biótipos X GR_{80}, referente ao controle visual da geração F2. Piracicaba, 2013-2014

Entre as populações suscetíveis, a dose necessária para reduzir o crescimento em 80% (controle satisfatório) variou entre 145,55 (± 12,50) e 755,84 (± 121,33) g e.a.ha^{-1}, com dose média de 505,8 e desvio padrão de 199,61 g e.a.ha^{-1} de glyphosate para a avaliação de massa seca. Portanto, para controlar o capim-branco, baseado na avaliação de fitomassa seca, a dose ideal será considerada como a média das GR_{80} dos biótipos suscetíveis + desvio padrão superior desses valores. Portanto, será de 505,8 + 199,61 = 705,41 g e.a. ha^{-1} de glyphosate. O gráfico a seguir (Figura 3.5), representa a frequência de biótipos relacionada com suas respectivas GR_{80}, para melhor ilustração da variabilidade da suscetibilidade das populações.

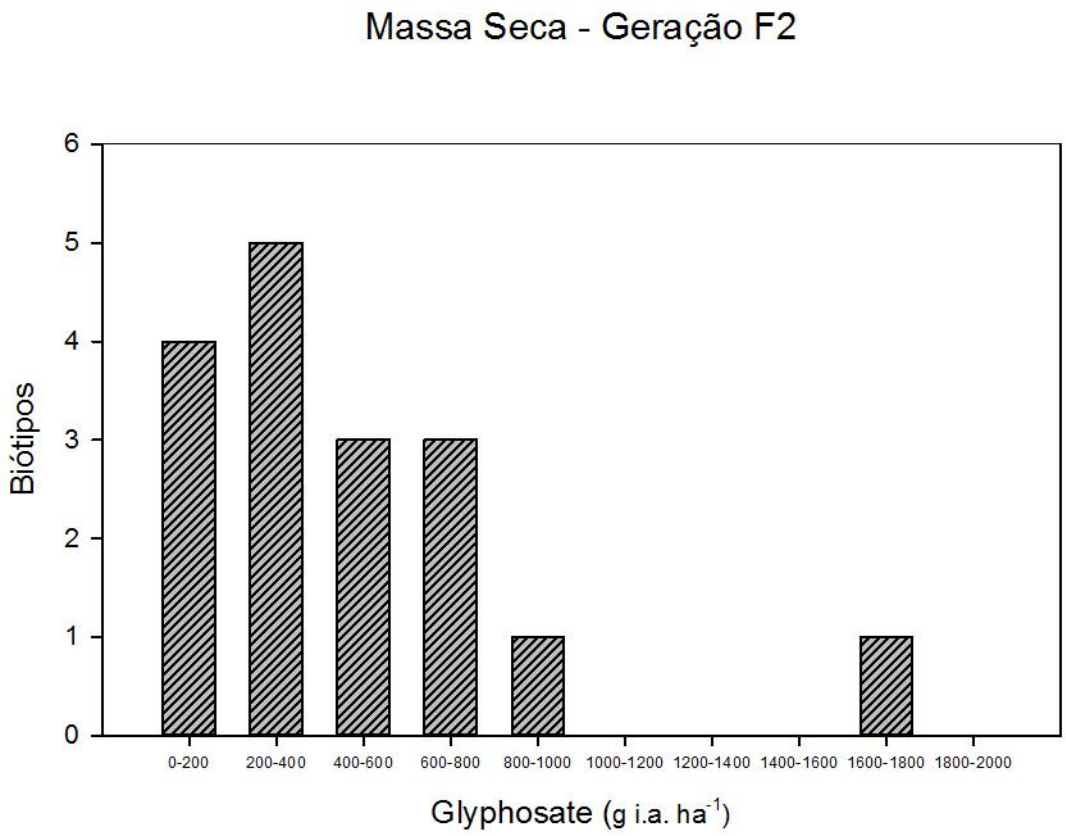

Figura 3.5 – Gráfico da frequência que representa a relação Biótipos X GR_{80}, referente à massa seca da geração F2. Piracicaba, 2013-2014

Tabela 3.7 – Parâmetros da equação referentes ao controle visual da geração F2 aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos. Piracicaba, 2013 – 2014

	Parâmetros estimados da equação não-linear* - Controle visual*				
Populações	**b****	**d**	**e**	**ED_{80}********	**ED_{95}**********
34	-8,91 ± 0,91	99,28 ± 0,39	115,03 ± 3,03	134,38 ± 5,52	160,38 ± 9,35
59	-3,5 ± 0,60	83,58 ± 3,64	550,39 ± 25,64	817,73 ± 80,4	1276 ± 217,84
61	-7,34 ± 0,76	98,81 ± 0,94	396,45 ± 5,11	477,59 ± 13,27	590,43 ± 28,72
66	-2,48 ± 0,14	100,18 ± 0,28	65,64 ± 1,56	114,86 ± 2,05	215,42 ± 11,10
67	-3,77 ± 0,26	102,4 ± 1,62	468,24 ± 10,59	675,83 ± 23,70	1020,8 ± 61,71
68	-17,52 ± 9,94	100,02 ± 0,30	370,66 ± 6,19	401,17 ± 24,69	438,48 ± 49,12
69	-3,29 ± 0.41	99.54 ± 5.41	862.17 ± 43.22	1312.8 ± 125.68	2105.8 ± 321.44
70	-12.3 ± 7.37	99.10 ± 0.40	151.16 ± 15.82	169.2 ± 6.43	192.04 ± 7.76
71	-7.71 ± 0.96	96.58 ± 1.34	411.68 ± 8.28	492.73 ± 17.92	603.01 ± 35.96
78	-8.76 ± 2.65	99.12 ± 0.46	159.41 ± 5.85	186.73 ± 2.65	223.06 ± 14.79
83	-4.51 ± -0.13	100.48 ± 0.40	238.08 ± 2.49	323.71 ± 5.08	457.23 ± 11.18
82	-13.35 ± 0.65	100.02 ± 0.00	212.24 ± 0.43	235.5 ± 0.78	264.69 ± 1.26
84	-4.01 ± 0.02	100.25 ± 0.09	127.41 ± 0.33	179.93 ± 0.66	265.18 ± 1.60
81	-2.67 ± 0.13	101.47 ± 0.70	139.43 ± 3.03	233.98 ± 7.75	418.66 ± 24.29
85	-4.24 ± 0.27	98.8 ± 0.71	132.96 ± 2.72	184.34 ± 5.49	266.13 ± 13.26
87	-12,95 ± 6,61	100,04 ± 1,56	389,88 ± 16,61	433,92 ± 41,62	489,39 ± 76,80
80	-3,2 ± 0,18	101,14 ± 0,73	154,76 ± 3,25	238,46 ± 7,36	387,67 ± 21,28

Notas: *: Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (GR_{50}); ** Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. ***: Controle visual aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos segundo recomendações da ALAM (ALAM, 1974). **** Quantidade necessária de herbicida para reduzir o crescimento em 80% comparada à testemunha não aplicada. ***** Quantidade necessária de herbicida para reduzir o crescimento em 95% comparado à testemunha não aplicada

Tabela 3.8 – Parâmetros da equação referentes à massa seca da geração F2 aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos. Piracicaba, 2013 - 2014

	Parâmetros estimados da equação não-linear* - Massa seca*				
Populações	**b****	**d**	**e**	**LD_{80}********	**LD_{95}**********
34	5,68 ± 1,09	26,12 ± 1,11	114,06 ± 6,48	145,55 ± 12,50	191,43 ± 25,19
59	1,75 ± 0,28	16,57 ± 1,05	447,33 ± 60,06	986,71 ± 139,12	2400,7 ± 599,85
61	2,19 ± 0,16	11,56 ± 0,31	281,91 ± 15,45	530,3 ± 28,19	1078,8 ± 95,42
66	5,81 ± 2,08	13,03 ± 0,69	145,43 ± 11,8	184,55 ± 10,80	241,21 ± 31,69
67	2,97 ± 0,44	16,12 ± 0,55	418,49 ± 23,61	666,79 ± 45,84	1125,6 ± 151,51
68	5,54 ± 1,86	15,07 ± 0,85	272,87 ± 28,60	350,37 ± 32,37	464,04 ± 69,93
69	1,38 ± 0,20	16,87 ± 0,87	595,95 ± 72,39	1626,4 ± 234,62	5026,8 ± 1426,7
70	19,48 ± 107,28	15,72 ± 1,04	162,58 ± 91,58	174,57 ± 30,39	189,1 ± 52,17
71	1,24 ± 0,22	14,92 ± 1,13	247,63 ± 53,62	755,84 ± 121,33	2649,3 ± 813,99
78	2,16 ± 0,17	18,72 ± 0,46	148,52 ± 6,73	281,71 ± 16,12	578,49 ± 60,26
83	2,19 ± 0,17	9,61 ± 0,26	205,67 ± 10,70	387,03 ± 26,01	787,71 ± 88,68
82	1,94 ± 0,32	15,14 ± 0,83	208,61 ± 22,12	424,98 ± 61,80	945,63 ± 241,33
84	1,27 ± 0,15	7,88 ± 0,39	237,16 ± 28,86	702,73 ± 99,64	2382,4 ± 615,51
81	2,16 ± 0,23	18,27 ± 0,63	177,85 ± 11,21	337,19 ± 29,29	692,04 ± 105
85	2,28 ± 0,31	10,71 ± 0,40	184,95 ± 12,83	339,13 ± 38,79	670,37 ± 132,02
87	1,04 ± 0,16	7,98 ± 0,54	139,54 ± 32,54	525,55 ± 95,77	2333,2 ± 808,47
80	12,86 ± 16,04	11,72 ± 0,98	160,86 ± 22,77	179,17 ± 4,24	202,25 ± 29,91

Notas: *: Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (LD_{50}); ** Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. ***: Massa seca mensurada aos trinta e cinco dias após a aplicação dos tratamentos. **** Quantidade necessária de herbicida para diminuir a massa seca em 80% em relação à testemunha não aplicada. ***** Quantidade necessária de herbicida para reduzir o crescimento em 95% comparado à testemunha não aplicada

Por fim, na Tabela a seguir (Tabela 3.9) podem ser observados, de forma organizada, os dados obtidos a partir dos experimentos de dose-resposta das gerações F1 e F2.

Tabela 3.9 – Quantidade do herbicida glyphosate necessária para obter-se 80% de controle, tanto na avaliação visual quanto na avaliação de massa seca. Piracicaba, 2013 – 2014

	Cálculo* da dose recomendada**	
	Controle visual	**Massa seca**
Primeira etapa	476,78	547,80
Segunda etapa	551,64	705,41
Dose Recomendada Calculada* (BHS)**	551,64	705,41

Notas: *Cálculo apenas considerando as populações suscetíveis. **Gramas de equivalente ácido por hectare. ***Dose recomendada considerando a média das GR_{80} e LD_{80} e seus desvios padrões superiores.

Diante do exposto, a maior dose necessária para controlar as populações que foram consideradas suscetíveis foi a dose de 705,41 g e.a. ha^{-1} do herbicida glyphosate, considerando que esta dose foi baseada no controle de 80% da planta capim-branco tanto nas avaliações visuais quanto nas avaliações de massa seca.

3.3.4 Quarta etapa – Determinação do fator de resistência

A última etapa do experimento de confirmação da resistência do capim-branco ao herbicida glyphosate comparou os biótipos escapes (populações 59 e 69) e a população suscetível 34.

Nas Figuras 3.6 e 3.7 podem ser observadas as curvas de dose-respostas correspondentes ao controle visual entre as populações 34 e 59 e 34 e 69, respectivamente, e em seguida a Tabela 3.10 com os dados obtidos a partir da regressão não-linear através do software computacional R. Houve grande diferença de suscetibilidade entre a população 34 e a população 59, bem como os intervalos de confiança a 95% bem próximos à regressão, indicando alta confiabilidade dos dados.

Imaginando-se uma reta paralela ao eixo dos tratamentos de glyphosate (eixo X) na altura da porcentagem de controle visual correspondente a 50% na Figura 3.6, é possível concluir que é necessária uma maior dose do herbicida glyphosate sobre a população 59 para obter o mesmo controle da população 34. Essa diferença é o GR_{50}, ou seja, quantidade de herbicida necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%, e a divisão entre o GR_{50} da população resistente e da população suscetível é o fator de resistência onde, nesse caso, é igual a 5,52. Por outro lado, para atingir o controle desejado pelo produtor rural, ou seja, 95%, seriam necessárias quase 13 vezes mais herbicida, como está na Tabela 3.10.

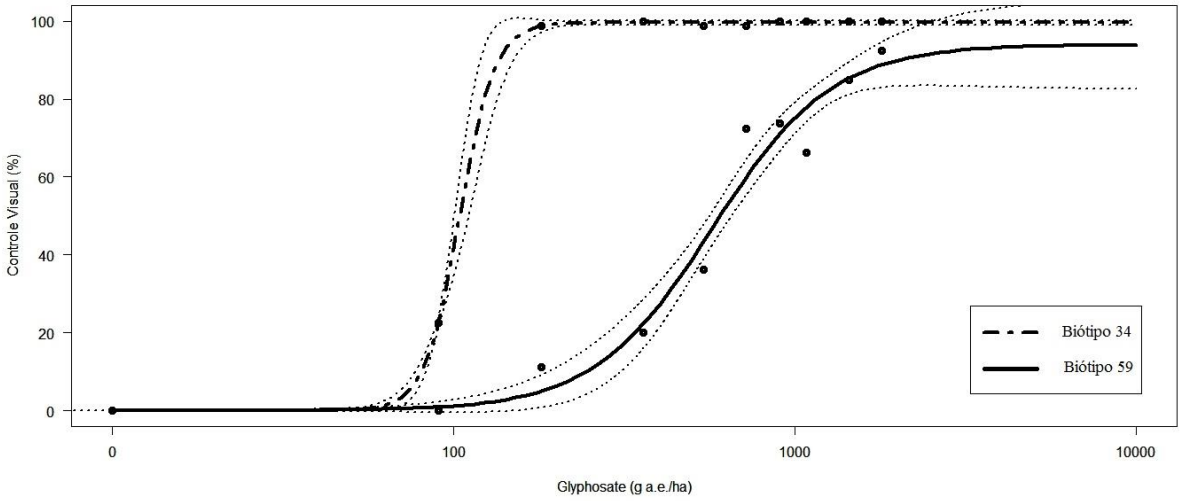

Figura 3.6 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 59, referentes à avaliação visual aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F1. Piracicaba, 2013 – 2014

Nesse mesmo sentido, a Figura 3.7 ilustra as curvas de dose-resposta referentes ao controle visual aos 35 dias das populações 34 e 69, onde a população 34 é representada pela linha tracejada e a população 69 é representada pela contínua, bem como cada uma com seu intervalo de confiança de 95% de probabilidade. O fator de resistência entre essas duas populações foi de 7,95 (Tabela 3.11), ou seja, foi necessária 7,95 vezes mais herbicida para controlar 50% da população com suspeita de resistência se comparada à população suscetível, enquanto que para reduzir o crescimento em 95% das duas populações, a população com suspeita de resistência (69) necessitaria quase 13 vezes mais herbicida, comparada com a população suscetível (34).

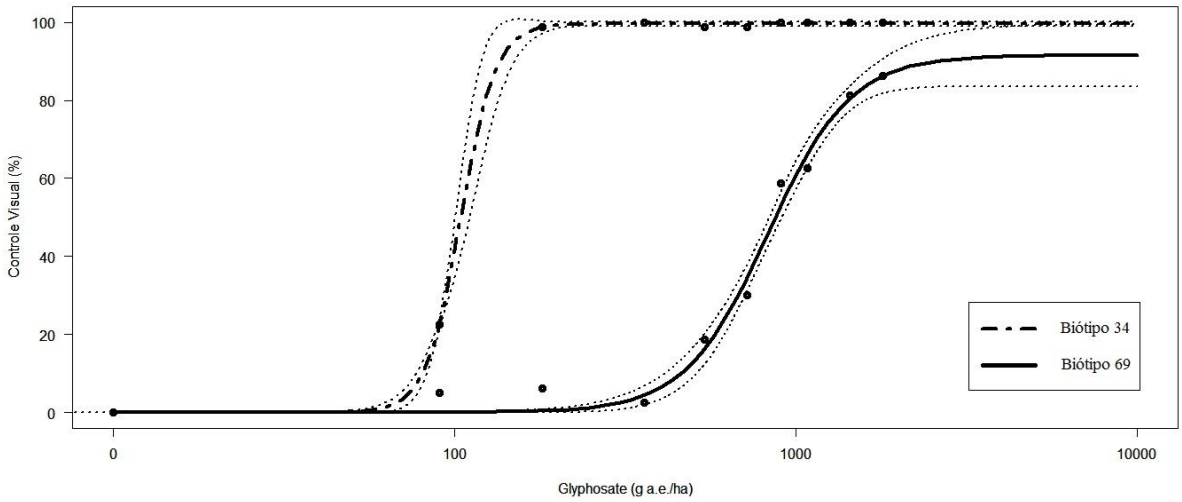

Figura 3.7 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 69, referentes à avaliação visual aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F1. Piracicaba, 2013 – 2014

Tabela 3.10 – Parâmetros referentes ao controle visual da geração F1. Piracicaba, 2013-2014

Parâmetros calculados[a] a partir de regressão não-linear referente ao controle visual						
População	**b[b]**	**d**	**e**	**GR_{80}**	**GR_{95}**	**FR[c]**
34	-8,54±1,31	5,02±0,73	103,97±2,37	122,29±5,81	146,77±11,1	5,52
59	-2,49±1,42	93,99±15,97	573,64±5,05	1000,4±147,5	1869,3±465,13	
34	-8,54±1,31	5,02±0,73	103,97±2,37	122,29±5,81	146,77±11,1	7,95
69	-3,59±0,38	91,53±3,96	826,41±30,15	1216±86,54	1876,9±217,58	

Notas: [a]Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (GR_{50}); [b]Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. [c] Fator de Resistência: razão entre a GR_{50} da população resistente e a GR_{50} da população suscetível

Alacón-Reverte et al. (2013), estudaram duas populações da planta daninha *Echinochloa colona* na Califórnia através de experimentos de dose-resposta, da qual uma população foi coletada em área de milho em área onde eram realizadas aplicações do herbicida glyphosate duas vezes por ano por mais de 6 anos e outra população em área sem histórico de aplicação desse herbicida, e obteve que a população sabidamente suscetível precisou de 210 g e.a ha^{-1} de glyphosate, equivalente a um quarto da dose recomendada para

aquela planta, para obter controle visual superior a 80% comparado com a testemunha não aplicada com estádio vegetativo de dois perfilhos, enquanto que a população com resistência não sofreu danos visíveis. O autor, calculando seu fator de resistência com base na LD_{50}, obteve o número 6,6, ou seja, foram necessárias 6,6 vezes mais herbicida para controlar 50% do biótipo resistente comparado com o biótipo suscetível. Esse valor encontrado por Alacón-Reverte é similar ao encontrado por Travlos e Chachalis (2010), que encontraram um fator de resistência para a espécie *Conyza bonariensis* variando entre 4 e 7 (controle visual e massa seca), porém maior que os encontrados por Ng et al. (2004) para a espécie *Eleusine indica* da Malásia.

A Figura 3.8 representa a massa seca das populações 34 e 59 aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos. A massa seca é uma medida fundamental na avaliação de experimentos não apenas com herbicidas, mas relacionados a plantas em geral, uma vez que avaliações como controle visual são subjetivas, e pode variar de avaliador para avaliador. Na literatura, é o método de avaliação mais utilizado (WISE et al., 2009; ZHENG et al., 2011; MARSHALL; MOSS, 2008; BURGOS et al., 2001; HAUSMAN et al., 2011; PATZOLDT et al., 2005; HAN et al., 2012).

Uma vez que a população suscetível 34 necessitou 108.66 g e.a. ha^{-1} de glyphosate para ter seu crescimento inibido em 50% e a população 59 necessitou de 1380.4 g e.a. ha^{-1} desse mesmo herbicida, o fator de resistência para essas populações comparadas, referentes à massa seca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos é de 4,8, ao passo que para a redução da massa seca de forma efetiva (95%) seriam necessárias mais de 21 vezes mais herbicida.

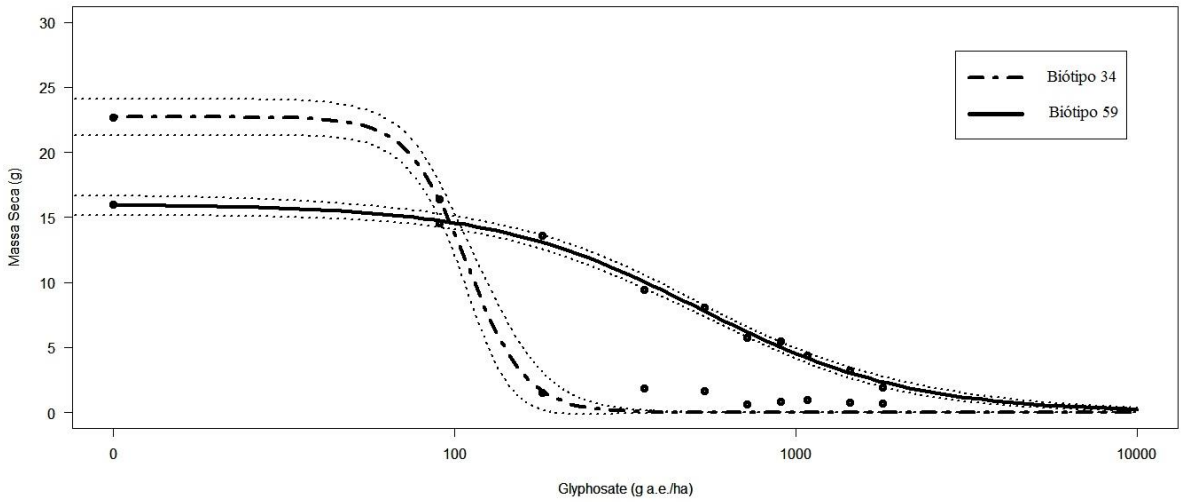

Figura 3.8 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 59, referentes à massa seca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F1. Piracicaba, 2013 – 2014

As curvas de dose-resposta referentes à massa seca das populações 34 e 69 são mostradas na Figura 3.9. A partir desta, é possível verificar que a massa seca da população com suspeita de resistência não atinge o "zero" gramas, o que torna a predição pela regressão não-linear imprecisa, elevando o erro padrão das estimativas (Tabela 3.11), como é o caso da GR_{95} da população supostamente resistente 69, que varia entre 4277.36 a 6770.24 g e.a. ha^{-1} de glyphosate.

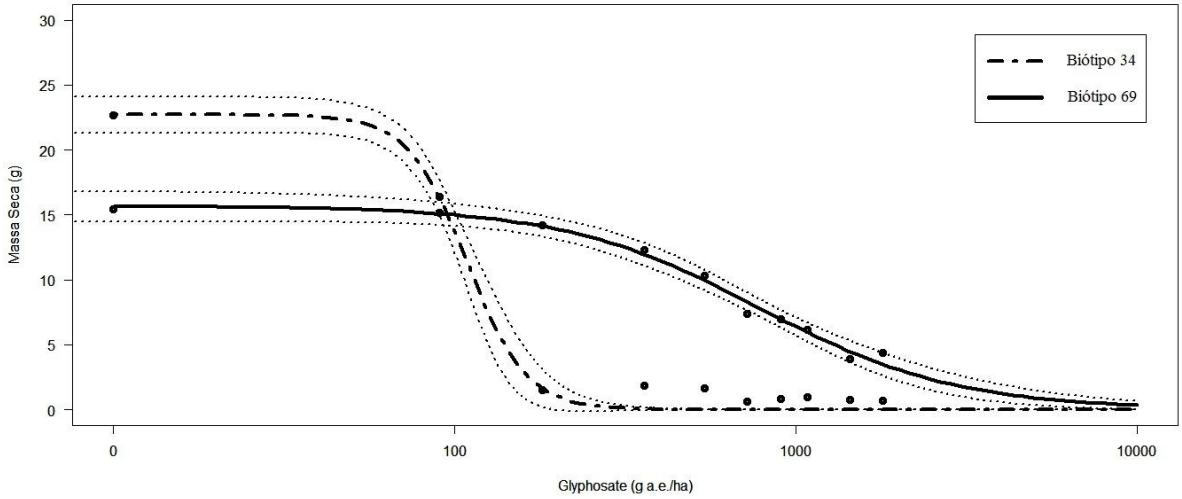

Figura 3.9 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 69, referentes à massa seca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F1. Piracicaba, 2013 – 2014

Tabela 3.11 – Parâmetros referentes à massa seca da geração F1. Piracicaba, 2013-2014

Parâmetros calculados[/a] a partir de regressão não-linear referente à massa seca						
Populações	**b[/b]**	**D**	**e**	**LD_{80}**	**LD_{95}**	**FR[/c]**
34	5.02±0.73	22.72±0.68	108.66±4.01	143.21±3.15	195.29±20.46	4.8
59	1.42±0.09	15.97±0.28	520.58±29.85	1380.4±76.75	4130.4±469.22	
34	5.02±0.73	22.72±0.68	108.66±4.01	143.21±3.15	195.29±20.46	4.42
69	1.50±0.19	15.67±0.58	780.76±63.79	1961.5±216.48	5523.8±1246.44	

Notas: [/a]Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (LD_{50}); [/b]Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. [/c] Fator de Resistência: razão entre a LD_{50} da população resistente e a LD_{50} da população suscetível

Partindo-se do pressuposto de que as características de resistência que um biótipo de planta daninha tem são características intrínsecas do DNA, é presumível que essas características sejam herdáveis (WSSA, 1998). Dessa forma a Figura 3.10 mostra a curva dose-resposta referente à avaliação de controle visual da geração F2, que compara a população 34 com a população 59. A Tabela 3.12 contém o fator de resistência (FR) entre essas duas populações e esses resultados são similares aos obtidos pela geração F1 (FR-F1 = 5.52; FR-F2 = 4.8). Nota-se que as curvas referentes ao intervalo de confiança da regressão são bastante próximas da curva principal (obtida pelas médias dos tratamentos) no trecho que contém a GR_{50}, porém distantes no trecho que é referente à GR_{95}, uma vez que o controle visual não atingiu 100% para a população supostamente resistente. Por outro lado, as curvas referentes ao intervalo de confiança da população suscetível são bem próximas à curva obtidas pelas médias da regressão dessa população, uma vez que o controle total (100%) foi obtido prontamente nos tratamentos intermediários, fazendo-se com que os erros referentes à GR_{95} sejam pequenos nessa população.

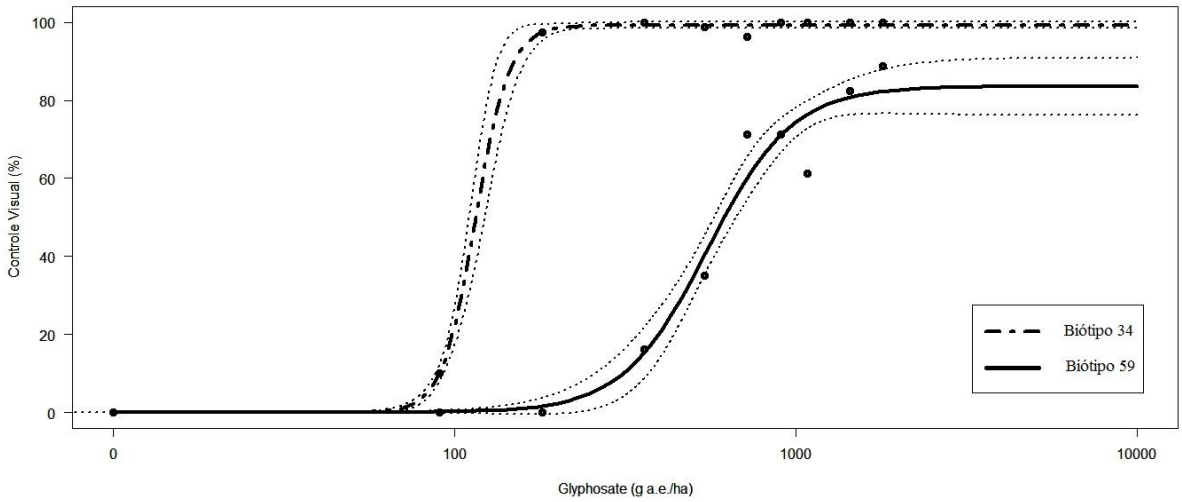

Figura 3.10 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 59, referentes à avaliação visual aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F2. Piracicaba, 2013 – 2014

Percorrendo o mesmo caminho da Figura 3.10, a Figura 3.11 mostra a comparação entre os biótipos 34 e 69. A geração F1 correspondente às populações 34 e 69 quando comparadas quanto a sua suscetibilidade ao herbicida glyphosate obtiveram fator de resistência similar ao da geração F2 (FR-F1 = 8.95; FR-F2 = 7.52), fato este que aumenta a confiança dos resultados obtidos e tende a uma comprovação da resistência do capim-branco ao herbicida glyphosate, já que a herdabilidade dos caracteres genéticos que propiciam a resistência das populações 59 e 69 tendem-se a ser confirmadas.

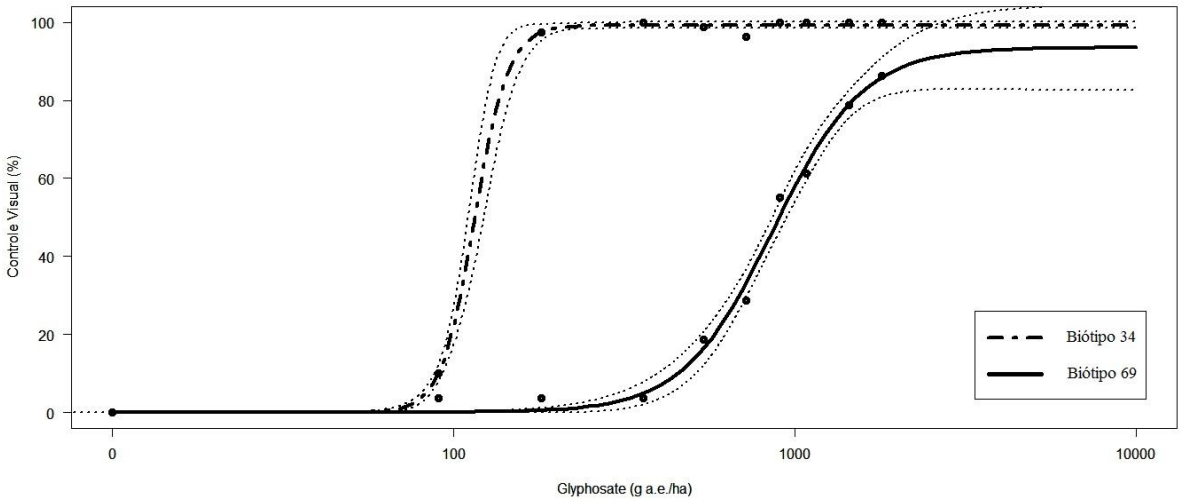

Figura 3.11 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 69, referentes à avaliação visual aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F2. Piracicaba, 2013 – 2014

Tabela 3.12 – Parâmetros referentes ao controle visual da segunda parte do trabalho. Piracicaba, 2013-2014

Parâmetros calculados[a] a partir de regressão não-linear referente ao controle visual						
Populações	**b[b]**	**d**	**e**	**GR_{80}**	**GR_{95}**	**FR[c]**
34	-8,91 ±0,91	99,28±0,39	115,03±3,03	134,38±5,52	160,38±9,35	4,8
59	-3,5±0,60	83,58±3,64	550,39±25,64	817,73±80,4	1276±217,84	
34	-8,91±0,91	99,28±0,39	115,03±3,03	134,38±5,52	160,38±9,35	7,52
69	-3,29±0,41	99,54±5,41	862,17±43,22	1312,8±125,68	2105,8±321,44	

Notas: [a]Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde 'x' é a dose do herbicida; 'b' é a declividade da curva ao entorno de 'e'; 'd' é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; 'e' é a dose que proporciona 50% de controle (GR_{50}); [b]Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. [c] Fator de Resistência: razão entre a GR_{50} da população resistente e a GR_{50} da população suscetível

Carvalho et al. (2011) estudando a planta daninha *Digitaria insularis*, fizeram um *screening* para confirmação de resistência dessa espécie ao herbicida glyphosate estudando 4 biótipos (R1, R2, R3 e S) através de ensaios em placas de Petri, dos quais 3 tinham suspeitadas de resistência ao glyphosate e um era de uma área sem histórico de aplicação. Em seu ensaio em casa de vegetação, para obter controle visual de 50% utilizando-se o herbicida

glyphosate, foram necessárias 63.6, 148.8, 249 e 248 g e.a ha^{-1} para, respectivamente, os biótipos S, R1, R2 e R3 (Suscetível, Resistente 1, Resistente 2 e Resistente 3). A partir dos dados de GR_{50}, os autores obtiveram fator de resistência de 2.3 (população R1), 3.9 (população R2) e 3.9 (população R3).

A relação entre as populações 34 e 59 (Figura 3.12), no que se diz respeito à massa seca, o fator de resistência entre as mesmas para a geração F2 é de 3.92, enquanto que a geração F1 teve o fator de resistência calculado de 4.8. Uma vez que a avaliação do controle visual é baseada em porcentagem em relação à testemunha, as diferenças de crescimento devido à época do ano não são notadas, enquanto que na avaliação de massa é mensurada a massa seca individual de cada repetição e, neste caso, não em porcentagem de redução de fitomassa em relação à testemunha. Por este motivo, é natural e esperado que as LD_{50}, LD_{80} e LD_{95} das plantas tratadas com glyphosate sejam diferentes, e, portanto, o fator de resistência também será diferente.

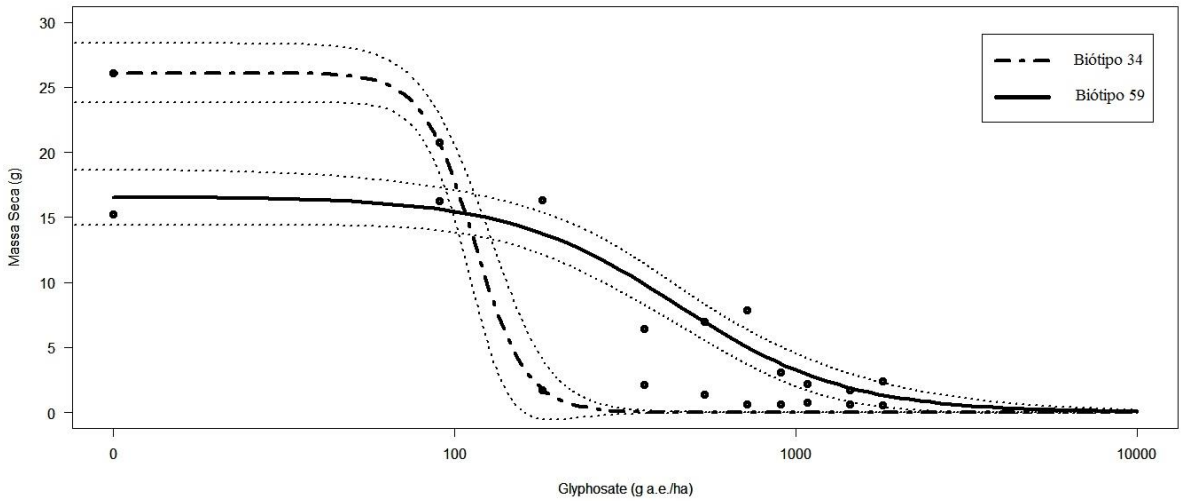

Figura 3.12 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 59, referentes à massa seca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F2. Piracicaba, 2013 – 2014

Confirmando o fator de resistência obtido na geração F1 entre as populações 34 e 69, a geração F2 teve relação de 5.22, ao passo que a geração F1 teve FR de 4.42, como é exibido na Tabela 3.13 e Figura 3.13.

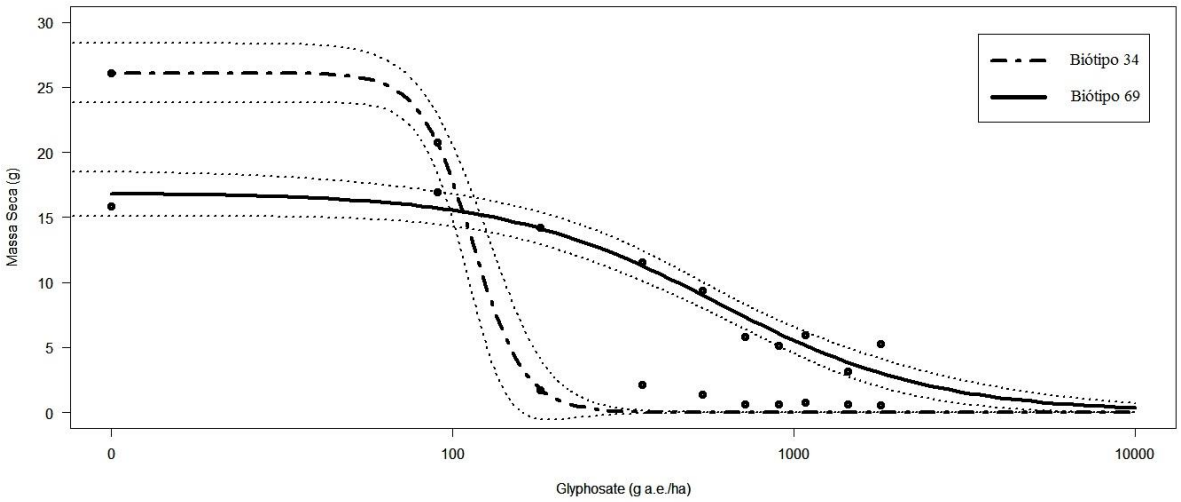

Figura 3.13 – Curva de dose-resposta das populações 34 e 69, referentes à massa seca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos da geração F2. Piracicaba, 2013 – 2014

Tabela 3.13 – Parâmetros referentes à massa seca da segunda parte do trabalho. Piracicaba, 2013 – 2014

Parâmetros calculados a partir de regressão não-linear referente a massa seca						
Populações	**b**	**d**	**E**	**LD_{80}**	**LD_{95}**	**FR[/d]**
34	5,68±1,09	26,12±1,11	114,06±6,48	145,55±12,50	191,43±25,19	3,92
59	1,75±0,28	16,57±1,05	447,33±60,06	986,71±139,12	2400,7±599,85	
34	5,68±1,09	26,12±1,11	114,06±6,48	145,55±12,50	191,43±25,19	5,22
69	1,38±0,20	16,87±0,87	595,95±72,39	1626,4±234,62	5026,8±1426,7	

Notas: [/a]Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, onde ‘x’ é a dose do herbicida; ‘b’ é a declividade da curva ao entorno de ‘e’; ‘d’ é o limite superior da curva, com limite inferior igual a zero; ‘e’ é a dose que proporciona 50% de controle (LD_{50}); [/b]Média ± erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. [/c] Fator de Resistência: razão entre a LD_{50} da população resistente e a LD_{50} da população suscetível

Mueller et al. (2011), estudando a possível existência de resistência de *Eleusine indica* ao glyphosate em campos do Tennessee (EUA) com dois biótipos (um com suspeita de resistência e outro sabidamente suscetível) através de experimentos de dose-respostas, e descobriram que os biótipos suscetíveis eram controlados eficientemente (controle visual maior que 90%) com 210 g e.a. ha^{-1}, da qual a dose recomendada para essa espécie de capim-pé-de-galinha era de 840 g e.a. ha^{-1}. Já os biótipos com suspeita de resistência tiveram

controle menor que 12% quando comparados à testemunha não aplicada. Ainda, segundo os mesmos autores, quando foi aplicada a dose recomendada (840 g e.a.ha^{-1}), o biótipo suscetível foi controlado eficientemente, ao passo que o biótipo resistente obteve controle visual de 45%, onde as plantas foram aplicadas quando tinham 1 a 4 perfilhos. Os autores calcularam um fator de resistência equivalente a 7,4. Corbett et al. (2004) documentaram que a aplicação de glyphosate a 840 g e. a. ha^{-1} era suficiente para ter controle de 99% de *Eleusine indica* com 10 centímetros de altura.

Norsworthy et al. (2011a) estudaram por meio de curvas de dose-resposta a possível seleção de biótipos resistentes ao glyphosate na espécie *Ambrosia trifida* nos Estados Unidos da América do Norte, em área onde a soja geneticamente modificada vinha sendo cultivada desde 1998. O autor estudou dois biótipos com suspeitas de resistência em campos dos quais a aplicação de glyphosate vinha acontecendo há anos e outras duas populações sabidamente suscetíveis, coletadas em áreas onde este herbicida nunca tinha sido utilizado. A quantidade necessária de herbicida para reduzir o crescimento dessa planta daninha em 50% (GR_{50}) foi de 164 g e.a. ha^{-1} para um biótipo suscetível e 335 g e.a. ha^{-1} para o outro biótipo suscetível. Já os biótipos resistentes precisaram de 765 g e.a. ha^{-1} e 1181 g e.a. ha^{-1}, obtendo um fator de resistência baseado na GR_{50} variando entre 2,3 e 7,2.

Riar et al. (2011) estudaram plantas escapes de *Sorghum halepense* (capim-massambará) em área onde o herbicida glyphosate vinha sendo usado em lavouras de soja por mais de 6 anos no estado do Arkansas, Estados Unidos da América do Norte, através de experimentos de dose-resposta. Enquanto que a dose recomendada por bula para o controle efetivo dessa planta daninha é de 840 g e.a. ha^{-1} de glyphosate, as plantas com suspeita de resistência necessitaram de 1440 g e. a. ha^{-1} de glyphosate para terem sua massa reduzida em 50% enquanto que as plantas suscetíveis necessitaram de 200 g e. a. ha^{-1} para sofrerem a mesma inibição, portanto, nesse estudo, o fator de resistência foi de 7,3, ou 1,7 vezes mais herbicida do que o recomendado em bula.

3.4 Conclusões

Das 87 populações analisadas nesta pesquisa, duas sobreviveram a uma aplicação de glyphosate na dose de 960 g e.a. ha^{-1} em níveis de controle considerados insatisfatórios, que foram as populações 59 e 69 (das quais serão designadas de 59R e 69R, bem como a

população 34, que será designada como 34S) evidenciando a potencialidade de serem possíveis novos casos de resistência da planta daninha ao glyphosate.

A dose recomendada calculada (BHS) obtida a partir de 15 populações consideradas suscetíveis ao herbicida glyphosate nesta pesquisa foi de 705,41 g e.a.ha^{-1}.

Comprovou-se cientificamente através da pesquisa a ocorrência um caso de resistência do capim branco ao glyphosate, através da população 59R e 69R, seguindo os critérios de comprovação de um caso de resistência de plantas daninhas a herbicidas.

Referências

ALACÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; URZÚA, J.; FISCHER, A. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 48-54, 2013.

ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v. 1, n. 1, p. 35-38, 1974.

BRUNHARO, C.A.C.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; MELO, M.S.C.; ALMEIDA PRADO, A.B.C.; OBARA, F.E.B.; ROSA, L.E. Suscetibilidade diferencial de Chloris polydactyla ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2012, Campo Grande. **Resumos expandidos**... Campo Grande: SBCPD, 2012. p. 59-64.

BURGOS, N.R.; KUK, Y.I.; TALBERT, R.E. *Amaranthus palmeri* resistance and differential tolerance of *A. palmeri* and *A. hybridus* to ALS inhibitor herbicides. **Pest Management Science**, Malden, v. 57, p. 449-457, 2001.

BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; STREIBIG, J.A.; DAVIS, V.M.; SHANER, J.L.; NORSWORTHY, J.K.; RITZ, C. Review: confirmation of resistance to herbicides and evolution of resistance levels. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 4-20, 2013.

CARVALHO, J.E.B.; VARGAS, L. Manejo e controle de plantas daninhas em frutíferas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. (Ed.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. p. 561-603.

CARVALHO, L.B.; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.L.C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRATO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, n. 2, p. 171-176, 2011.

CARVALHO, S.J.P.; PEREIRA SILVA, R.F.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento, desenvolvimento e produção de sementes da planta

daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 4, p. 603-609, 2005.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: _____. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 9-29.

CORBETT, J.L.; ASKEW, S.D.; THOMAS, W.E.; WILCUT, J.W. Weed efficacy evaluations of bromoxynil, glufosinate, glyphosate and pyrithiobac and sulfosate. **Weed Technology**, Lawrence, v. 18, p. 443-453, 2004.

DILL, G.M.; CAJACOB, C.A.; PADGETTE, S.R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 326-331, 2008.

DYER, W.E. Resistance to glyphosate. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Ed.). **Herbicide resistance in plants:** biology and biochemistry. Boca Raton: Lewis, 1994. p. 229-242.

HALL, L.M.; STROKE, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, Lawrence, v. 46, p. 390-396, 1998.

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

HAUSMAN, N.E.; SINGH, S.; TRANEL, P.J.; RIECHERS, D.E.; KAUNDUN, S.S.; POLGE, N.D.; THOMAS, D.A.; HAGER, A.G. Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. **Pest Management Science**, Malden, v. 67, p. 258–261, 2011.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 20 set. 2013.

HEAP, I.; LEBARON, H. Introduction and overview of resistance. In: POWLES, S.B.; SHANER, D.L. (Ed.). **Herbicide resistance in world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 1-22.

HERBICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. Disponível em: <http://www.hracglobal.com/Education/DetectingHerbicideResistance.aspx>. Acesso em: 12 abr. 2014.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale – general for descriptions pf the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, p. 433-441, 1997.

JOHNSON, W.G.; OWEN, M.D.K.; KRUGER, G.R.; YOUNG, B.G.; SHAW, D.R.; WILSON, R.G.; WILCUT, J.W.; JORDAN, D.L.; WELLER, S. U.S. farmer awareness of

glyphosate-resistant weeds and resistance management strategies. **Weed Technology**, Lawrence, v. 23, p. 308-312, 2009.

KNEZEVIC, S.Z.; STREIBIG, J.C.; RITZ, C. Utilizing R software for dose-response studies: the concept and data analysis. **Weed Technology**, Lawrence, v. 21, p. 840-848, 2007.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 2008. 672 p.

MARSHALL, R.; MOSS, S.R. Characterization and molecular basis of ALS inhibitor resistance in the grass weed *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research**, Oxford, v. 48, p. 439-447, 2008.

MATHEIS, H.A.S.M.; AZEVEDO, F.A.; VICTORIA FILHO, R. Adubação verde no manejo de plantas daninhas na cultura de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, n. 1, p. 101-110, 2006.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso *(Digitaria insularis)* suscetível e resistente ao glyphosate.** 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadenses* e *C. bonariensis* ao herbicida ghyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

MUELLER, T.C.; BARNETT, K.A.; BROSNAN, J.T.; STECKEL, L.E. Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennesee. **Weed Science**, Lwrence, v. 54, n. 4, p. 562-566, 2011.

NANDULA, V.K.; POSTON, D.H.; EUBANK, T.W.; KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Differential response to glyphosate in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations from Mississippi. **Weed Technology**, Lawrence, v. 21, p. 477-482, 2007.

NG, C.H.; WICKENSWARY, R.; SURIF, S. ISMAIL, B.S. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed Science**, Lawrence, v. 52, p. 564–570, 2004.

NICOLAI, M.; MELO, M.S.C.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLEI, P.J. Monitoramento de infestações de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suspeitas de resistência ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 26., 2010. Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 943-946.

NORSWORTHY, J.K.; RIAR, D.; JHA, P.; SCOTT, R.C. Confirmation, control, and physiology of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in Arkansas. **Weed Technology**, Lawrence, v. 25, n. 3, p. 430-435, 2011a.

NORSWORTHY, J.K.; MCCLELLAND, M.; GRIFFITH, G.; BANGARWA, S.; STILL, J. Evaluation of cereal and Brassicaceae cover crops in conservation-tillage, enhanced glyphosate-resistant cotton. **Weed Technology**, Lawrence, v. 25, p. 6-13, 2011b.

PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; HAGER, A.G. A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype with multiple resistance across three herbicide sites of action. **Weed Science**, Lawrence, v. 53, p. 30-36, 2005.

PINOTTI, E.B.; SALES, T.C.; MINATEL, L.F.C.; BARBOSA, R.Z. Levantamento florístico de plantas daninhas na cultura da laranja (*Citrus sinensis*). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 7, n. 15, p. 1-6, jun. 2009.

PITELLI, R.A. As plantas daninhas e o manejo de pomares de citros. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, n. 43, p. 6-8, 2004.

PLÁCIDO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; MARTINS, A.; PAIOLA, A.; MENÉNDEZ, J.; DE PRADO, R. Resistencia a glifosato em biotipos de *Chloris polydactyla* (L.) SW. recolectados em Brasil. **Resvista Agropecuaria y Florestal**, Santo Domingo, v. 2, n. 1, p. 19-22, 2013.

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; JOHNSON, D.B.; SCOTT, R.C.; BAGAVATHIANNAN, M. Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 299-304, 2011.

RIPPERT, P.; SCIMEMI, C.; DUBALD, M.; MATRINGE, M. Engineering plant Shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 134, p. 92-100, 2004.

RITZ, C. Toward a unified approach to dose–response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology Chemistry**, Malden v. 29, p. 220-229, 2010.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 12, n. 5, p. 1-21, 2005.

RITZ, C.; CEDERGREEN, N.; JENSEN, J.E.; STREIBIG, J.C. Relative potency in nonsimilar dose–response curves. **Weed Science**, Lawrence, v. 54, p. 407-412, 2006.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TRAVLOS, I.S.; CHACHALIS, D. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) is reported in Greece. **Weed Technology**, Lawrence, v. 24, p. 569-573, 2010.

VELINI, E.D.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B.; GOMES, G.L.G.C.; MESCHEDE, D.K.; DUKE, S.O. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E. D.; CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**: uso sustentável. Botucatu: FEPAF, 2012. p. 39-66.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Resistance and tolerance definitions. **Weed Technology**, Lawrence, v. 12, p. 789, 1998.

WISE, A.M.; GREY, T.L.; PROSTKO, E.P.; VENCILL, W.K.; WEBSTER, T.M. Establishing the geographical distribution and level of acetolactase synthase resistance of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions in Georgia. **Weed Technology**, Lawrence, v. 23, p. 214-220, 2009.

ZHENG, D.; KRUGER, G.R.; SINGH, S.; DAVIS, V.M.; TRANEL, P.J.; WELLER, S.C.; JOHNSON, W.G. Cross-resistance of horseweed (*Conyza Canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest Management Science**, Malden, v. 67, p. 1486-1492, 2011.

4 ANÁLISE COMPARATIVA DO CRESCIMENTO DE BIÓTIPOS DE CAPIM-BRANCO (*Chloris polydactyla*) RESISTENTE E SUSCETÍVEL AO GLYPHOSATE

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de custo adaptatito do biótipo 69R, por meio de comparação dos crescimentos entre este e o biótipo suscetível 34S. Para tal fim, foram realizadas avaliações destrutivas ao longo do tempo, até os 129 dias após a semeadura, na qual foi avaliada a área foliar, massa seca dos limbos foliares, massa seca dos colmos, massa seca das raízes, massa seca total e a taxa de crescimento absoluto. Não foi possível inferir de forma clara que existem diferenças de crescimento entre os biótipos resistentes e suscetível de capim branco, que implicaria em custo adaptativo do biótipo resistente. No entanto, fica evidente que nas fases iniciais de crescimento, o biótipo 34S foi superior ou estatisticamente igual ao biótipo 69R até o fim de seu ciclo, quando o biótipo 69R teve maior acúmulo de massa seca e se igualou ao biótipo 34S em todas as avaliações.

Palavras-chave: Custo adaptativo; Curva de crescimento; Taxa de crescimento absoluto

Abstract

The aim of this study was to evaluate the possible fitness penalty over biotype 69R by comparison of its growth and the susceptible biotype 34S. For that, destructive evaluations were performed over time until 129 days after sowing, in which were evaluated the leaf area, dry weight of leaf, stems dry weight, roots dry weight, total dry weight and absolute growth rate. It was impossible to infer accurately that there are differences in growth among the resistant and susceptible biotypes of Tall windmill grass, which would imply in fitness penalty for the resistant biotype. However, it is evident that in the early growth stages, the 34S biotype had or a better development or statistically equal to biotype 69R until the end of the experiment, when the 69R biotype had greater dry matter accumulation and reached the biotype 34S biomass in all evaluations.

Keywords: Fitness cost; Growth curves; Absolute growth rate

4.1 Introdução

A infestação das plantas daninhas em áreas agrícolas é um fator redutor de produtividade aos sistemas de produção, sendo que a utilização de herbicidas é o elemento chave para seu controle. Entretanto, a aplicação intensiva e repetitiva de herbicidas específicos em vastas populações de plantas daninhas é um forte agente seletor de indivíduos resistentes, o que vem ocorrendo em diversos sistemas de produção nas últimas décadas (POWLES; SHANER, 2001).

Um dos princípios básicos da genética evolutiva é de que a adaptação a um novo ambiente, com a presença de um agente seletor, geralmente trará efeitos negativos aos agentes selecionados, conhecido também como “custo adaptativo” (PURRINGTON, 2000; STRAUSS

et al., 2002). Esses custos adaptativos podem prevenir a fixação de um novo alelo (TIAN et al., 2003) e contribui para a manutenção do polimorfismo dentro da população (ANTONOVICS; THRALL, 1994).

Entretanto, tem sido observado que em alguns casos, a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas não necessariamente traz prejuízos adaptativos aos indivíduos (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE III, 1997). O entendimento das consequências que a resistência traz às plantas daninhas na presença e ausência do herbicida é importante para ajudar na compreensão da dinâmica evolutiva da resistência (NEVE et al., 2003).

A resistência ao glyphosate é conferida geralmente por um gene simples semi-dominante (BECKIE, 2011). Entretanto, a resistência de alguns biótipos de *Lolium rigidum* (YU; CAIRNS; POWLES, 2007; SIMARMATA; BUGHRARA; PENNER, 2005) e *Amaranthus tuberculatus* (ZELAYA; OWEN, 2005) vem sendo atribuídas a múltiplos genes. Em casos de resistência múltipla a herbicidas em *Lolium rigidum*, segundo Preston et al. (2009) e Yu, Cairns e Powles (2007), o fluxo gênico entre plantas ocorre por troca de pólen, uma vez que esta espécie possui polinização cruzada, fato este que aumenta a importância do conhecimento do tipo de polinização da planta daninha e sua interação ecológica.

Quando a alteração de um alelo que confere resistência também implica em custo adaptativo existem, segundo Vila-Aiub et al. (2009), pelo menos três explicações para a sua origem: (a) o custo adaptativo resulta de um nova mutação no sítio de ação em que o herbicida atua, e essa mutação também compromete ou interfere, em algum nível, com o funcionamento normal do metabolismo da planta (COHAN; KING; ZAWADZKI, 1994; GROETERS et al., 1994; CHEVILLON et al., 1995). Por exemplo, uma simples substituição em um aminoácido pode causar uma modificação estrutural na enzima, tornando a planta insensível ao herbicida, porém essa mudança estrutural também afeta as funções catalíticas da enzima (TRANEL; WRIGHT, 2002; DÉLYE et al., 2005; POWLES; PRESTON, 2006). (b) A resistência é, de certa forma, um mecanismo de defesa da planta em resposta à ação dos herbicidas, e esse mecanismo pode comprometer o direcionamento de reservas para a produção de massa seca e órgãos reprodutivos, segundo a teoria da “fonte-dreno” (COLEY; BRYANT, 1985; CHAPIN; AUTUMN; PUGNAIRE, 1993; HERMS; MATTSON, 1992). Por exemplo, a resistência devido ao metabolismo do herbicida por plantas pode, em alguns casos, ser devido a uma maior produção de enzimas do complexo P450 (WERCK-

REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000). Assim, a maior produção dessas enzimas causaria um custo adicional de energia que seria “tirado” dos órgãos reprodutivos e do crescimento, causando o custo adaptativo. (c) Por fim, o custo adaptativo pode ser causado por consequência de alterações nas interações ecológicas dos indivíduos (PURRINGTON, 2000; STRAUSS et al., 2002). Se um alelo possui efeito pleiotrópico, onde este ao mesmo tempo regula algum fenótipo atrativo a polinizadores, resistência a doenças e resistência a herbicidas, estes indivíduos terão a capacidade de sobreviver após a exposição a herbicidas, porém terão outras desvantagens ecológicas (SALZMANN et al., 2008).

Existem casos em que o custo adaptativo pode não apenas só provocar redução no desenvolvimento da planta. No caso de plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS, existem casos em que a mutação do sítio de ação causa diminuição (ASHIGH; TARDIF, 2007; EBERLEIN et al., 1997, 1999), aumento (BOUTSALIS; KAROTAM; POWLES, 1999; YU et al., 2003, 2007) e indiferença (PRESTON et al., 2006) quanto ao custo adaptativo.

Segundo Jasieniuk et al. (1996) e Preston e Powles (2002), os alelos que conferem resistência a plantas daninhas e que carregam maiores custos adaptativos são menos comuns do que aqueles que carregam menores custos adaptativos dentro de uma população. Ainda segundo os autores, geralmente os genes que conferem resistência a herbicidas são raros dentro de uma população quando não existe o agente selecionador herbicida, muito provavelmente devido ao custo adaptativo que esses genes conferem às plantas daninhas.

A resistência ao glyphosate surgiu depois de um longo tempo após o início de seu uso na agricultura, comparativamente a outros mecanismos de ação, levando em consideração que este herbicida vem sendo usado por mais de 40 anos (PRESTON et al., 2009). Uma das sugestões mais consideradas pela comunidade científica é que há custo adaptativo relacionado à resistência ao glyphosate, sendo essa penalidade suficiente para suprimir os indivíduos resistentes em meio à população (BRADSHAW et al., 1997). Entretanto, estudos com biótipos resistentes vem indicando que a resistência ao glyphosate não causa custo adaptativo em todos os casos (DAVIS et al., 2009; PEDERSEN et al., 2007; SHRESTHA et al., 2010; ZELAYA; OWEN; VANGESSEL, 2004).

Segundo Vila-Aiub et al. (2009), o custo adaptativo negativo em biótipos resistentes poderia, teoricamente, modificar a população das plantas daninhas para a maior presença de indivíduos suscetíveis, uma vez que o agente selecionador fosse retirado da equação. Por

outro lado, segundo Giacomini et al. (2014), em plantas daninhas como o *Amaranthus palmeri*, a ausência do custo adaptativo provavelmente resultará na persistência dos indivíduos resistentes ao glyphosate na população mesmo com a retirada do agente selecionador, levando a perda da ferramenta glyphosate a longo termo. Como até o momento não existem trabalhos que compararam o crescimento entre biótipos de capim-branco resistente e suscetíveis ao glyphosate no Brasil, foi realizado este estudo com o objetivo de elaborar curvas de crescimento comparativas entre os biótipos suscetível (biótipo 34S) e resistente (biótipo 69R) ao glyphosate, sendo então possível inferir se há custo adaptativo para o biótipo resistente ao glyphosate nesta planta daninha.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP (22º42’31.52.11’’ S; W 47º37’41.01’’ W), equipada com irrigação diária média de 4mm distribuídos ao longo do dia, entre os meses de dezembro e abril. As sementes dos biótipos 34S (suscetível) e 69R (resistente) foram semeadas em substrato comercial Genesolo® (N=0,5%; C_{org}=15%; Relação C/N=20; CTC=90) na quantidade de 100 unidades de cada biótipo, em vasos plásticos com capacidade para 5 litros. Devido à constituição do substrato utilizado, não foi realizada a adubação dos vasos, uma vez que esta poderia interferir nas conclusões dos resultados, optando-se por uma homogeneidade de fertilidade do substrato. Foi realizado desbaste logo após a emergência das plantas para a obtenção de uma planta por vaso, procurando deixar plantas de tamanho uniforme em todos os vasos. O delineamento experimental escolhido foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e 14 tratamentos, em que cada tratamento constou de uma avaliação de colheita das plantas de ambos os biótipos separando-se suas partes em raízes, limbos foliares e colmos. Para evitar-se a dispersão de sementes resistentes de capim-branco, as avaliações foram realizadas somente até o início da emissão da panícula.

Foram feitas avaliações destrutivas periodicamente, medindo-se a área foliar dos indivíduos, massa seca das folhas, massa seca das raízes e massa seca dos caules. Os limbos foliares foram cortados com tesoura e suas áreas medidas através do aparelho LI – 3100 Area Meter (LI-COR, inc., Lincoln, Nebraska, USA) e armazenados em sacos de papel para avaliação da massa seca. Em seguida, o substrato com as raízes foram cuidadosamente lavados em água corrente para avaliar a massa das raízes e depois eram separadas dos colmos.

Os colmos, as raízes e os limbos foliares foram armazenados em estufa de circulação forçada a 75°C por três dias, para a obtenção da massa seca. A taxa de crescimento absoluto, que expressa o incremento da massa seca em g dia^{-1}, também foi calculada pela fórmula: $G = (Wt_2 - Wt_1) / (t_2 - t_1)$, em que G é a taxa de crescimento absoluto, Wt_2 e Wt_1 são as massas secas totais de duas amostras consecutivas, coletadas nos tempos t_2 e t_1, que são os dias decorridos entre as duas observações, como utilizado por Carvalho et al. (2005) e Calbo et al. (1989).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste da normalidade de Shapiro-Wilk e em seguida foram analisadas as variâncias dos tratamentos pelo teste F. As curvas de crescimento foram obtidas com o software Sigmaplot 12.0 (SYSTAT SOFTWARE, SAN JOSE, CA) e os dados do teste t-student não-pareado, para todas as avaliações, foram obtidos através do software Excel®, todos a 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e Discussão

O gráfico presente na Figura 4.1 ilustra a evolução da área foliar dos biótipos de capim-branco resistente e suscetível ao glyphosate. A escala do gráfico da Figura 4.1 não permite a afirmação da diferença significativa entre os biótipos na evolução inicial da área foliar. Por outro lado, através da Tabela 4.1, é possível verificar os valores do teste t, que devem ser interpretados da seguinte forma: se o valor de “p-value” for maior que a probabilidade de 5% (ou 5% de significância, ou 0,05) a hipótese da nulidade não deve ser rejeitada, ou seja, não existe diferença significativa entre os biótipos. Por outro lado, se os valores forem menores que 0,05, rejeita-se a hipótese da nulidade, e considera-se que os biótipos possuem crescimentos estatisticamente diferentes. Dessa maneira, a partir da coluna referente à área foliar, é possível inferir que os biótipos tiveram crescimentos estatisticamente diferentes até os 119 dias com superioridade na produção de área foliar do biótipo 34S, onde a partir desse momento, os biótipos tiveram área foliar estatisticamente igual. Este fato pode ser confirmado pelo gráfico da taxa de crescimento absoluto (Figura 4.6), do qual dos 100 aos 109 dias, o biótipo 69R teve incremento de acúmulo de matéria seca estatisticamente superior ao biótipo 34S.

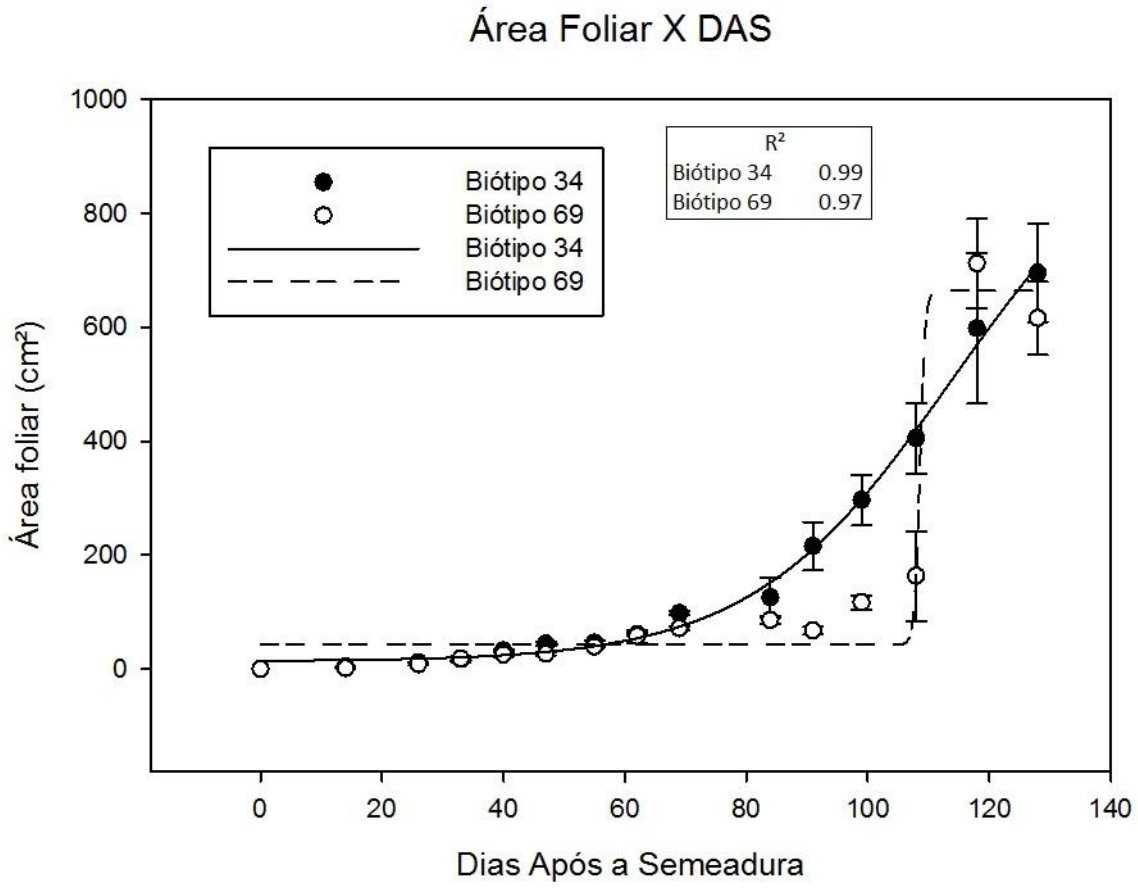

Figura 4.1 – Evolução da área foliar dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, 2013-2014

As equações 4.1 e 4.2 representam, respectivamente, o biótipo 34S e 69R, e a equação que mais se ajustou ao modelo foi a do tipo sigmoide, com quatro parâmetros, onde os coeficientes de determinação foram, respectivamente, 0,99 e 0,97. Segundo Causton et al. (1978), a descrição do crescimento de plantas através de equações matemáticas pode auxiliar na sumarização dos dados de forma conveniente, pode estimar atributos de crescimento derivado dos resultados e ajuda no fornecimento de informações por meio dos parâmetros da equação.

$$f = \frac{13.19 + 988.37}{1 + (\exp(-\frac{x - 113.83}{16.44})} \quad (4.1)$$

$$f = \frac{42.92 + 621.24}{1 + (\exp(-\frac{x - 108.61}{0.43})} \quad (4.2)$$

Carvalho et al. (2005), observaram acúmulo de área foliar do capim-branco até cinco vezes maior que o observado nessa pesquisa ao final dos 140 dias de ciclo da qual, da mesma forma que a presente pesquisa, foi avaliado biótipo com ausência de competição, em condições controladas de casa de vegetação.

O gráfico presente na Figura 4.2 evidencia a mesma tendência de resultados da massa seca e da área foliar. Entretanto, de acordo com a Tabela 4.1, não foi possível estabelecer uma relação linear entre os biótipos, uma vez que o biótipo 34S teve acúmulo superior de massa seca nos limbos foliares nas avaliações de 14, 63, 70, 92, 100 e 109, enquanto que nas demais não houve diferença significativa, apesar de ser possível inferir pela Figura 4.2 que o biótipo 34S teve médias de acúmulo de massa seca maior que o biótipo 69R, onde, por fim, essa variável se tornou igual para ambos os biótipos. As equações 4.3 e 4.4 representam as curvas referentes ao biótipo 34S e 69R, respectivamente, com coeficientes de determinação de 0,99 e 0,93, onde novamente a equação sigmoide foi a que melhor se ajustou ao modelo, com quatro parâmetros.

Moreira et al. (2010) estudando biótipos de buva (*Conyza spp*.) e Melo (2011) estudando o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), diferentemente da metodologia adotada nesta pesquisa, usaram como avaliações a massa seca total das partes das plantas suscetíveis e resistentes ao glyphosate, o que incluiu a massa seca dos limbos foliares + colmos e raízes, enquanto que na presente pesquisa foi adotada a separação mais detalhada dos órgãos vegetais. Apesar disso, foi possível notar-se por essa pesquisa a partir da observação dos gráficos das Figuras 4.2 e 4.3 que existe, em questões de proporcionalidade, uma relação bastante íntima entre a massa dos colmos e a massa dos limbos foliares.

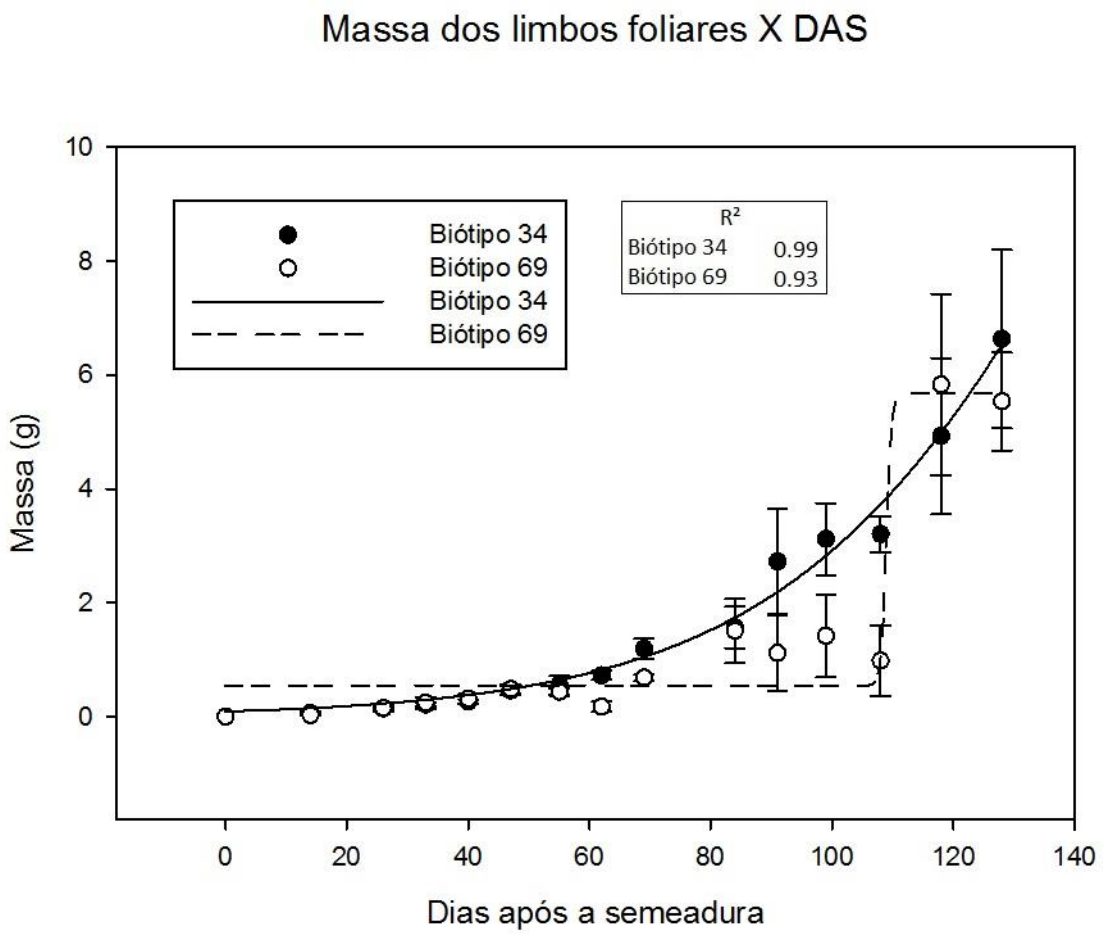

Figura 4.2 – Evolução da massa seca dos limbos foliares dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, 2013-2014

$$f = \frac{22.97}{1 + (\exp(-\frac{x - 153.73}{27.86})} \tag{4.3}$$

$$f = \frac{0.54 + 5.13}{1 + (\exp(-\frac{x - 108.99}{0.41})} \tag{4.4}$$

A Figura 4.3 representa a massa seca dos colmos dos biótipos 34S e 69R. Essa variável acusou diferença significativa apenas em quatro das 14 avaliações realizadas. Apesar das médias do biótipo 34S terem sido maiores que as do biótipo 69R, como se pode observar

na Figura 4.3, essas diferenças foram anuladas pela grande variação entre as parcelas experimentais como pode se observar nas médias do 100º, 119º e 129º dias, que possuem as barras de desvio padrão bastante extensas. As equações obtidas que representam as curvas de massa de colmos estão descritas na equação 4.5 para o 34S e a equação 4.6 é referente ao biótipo 69R, com coeficientes de determinação de 0,96 e 0,91, respectivamente, onde a equação escolhida foi a sigmoide com quatro parâmetros.

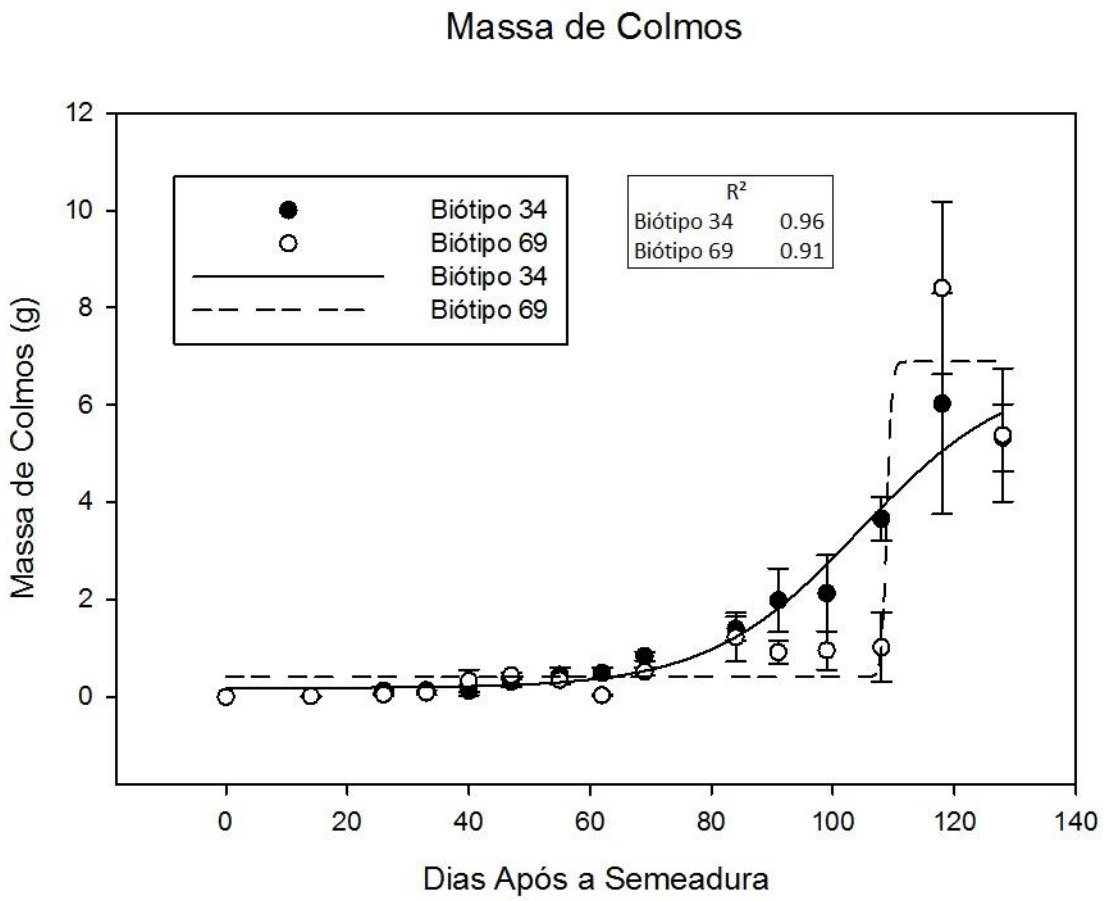

Figura 4.3 – Evolução da massa seca dos colmos dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, 2013-2014

$$f = \frac{0.18 + 6.52}{1 + (\exp(-\frac{x - 104.57}{12.43})} \tag{4.5}$$

$$f = \frac{0.40 + 6.48}{1 + (\exp(-\frac{x - 108.89}{0.39})} \tag{4.6}$$

A Figura 4.4 ilustra o desenvolvimento do sistema radicular dos biótipos estudados. Através dos coeficientes de determinação, é possível inferir o bom ajuste do modelo sigmoide com quatro parâmetros para ambos os biótipos, dos quais as curvas são representadas pelas equações 4.7 e 4.8 dos biótipos 34S e 69R, respectivamente. O teste de comparação t-student a 5% de probabilidade evidenciou que houve diferença estatística entre o desenvolvimento do sistema radicular entre os biótipos nas avaliações aos 34, 41, 48, 70 e 109 dias após a semeadura, com maior acúmulo de massa seca das raízes pelo biótipo 34S, onde nas demais avaliações não foi possível constar diferenças significativas, apesar de que apenas nas avaliações aos 119 e 129 dias após a semeadura o biótipo 69R foi superior, como pode ser observado na Tabela 4.1.

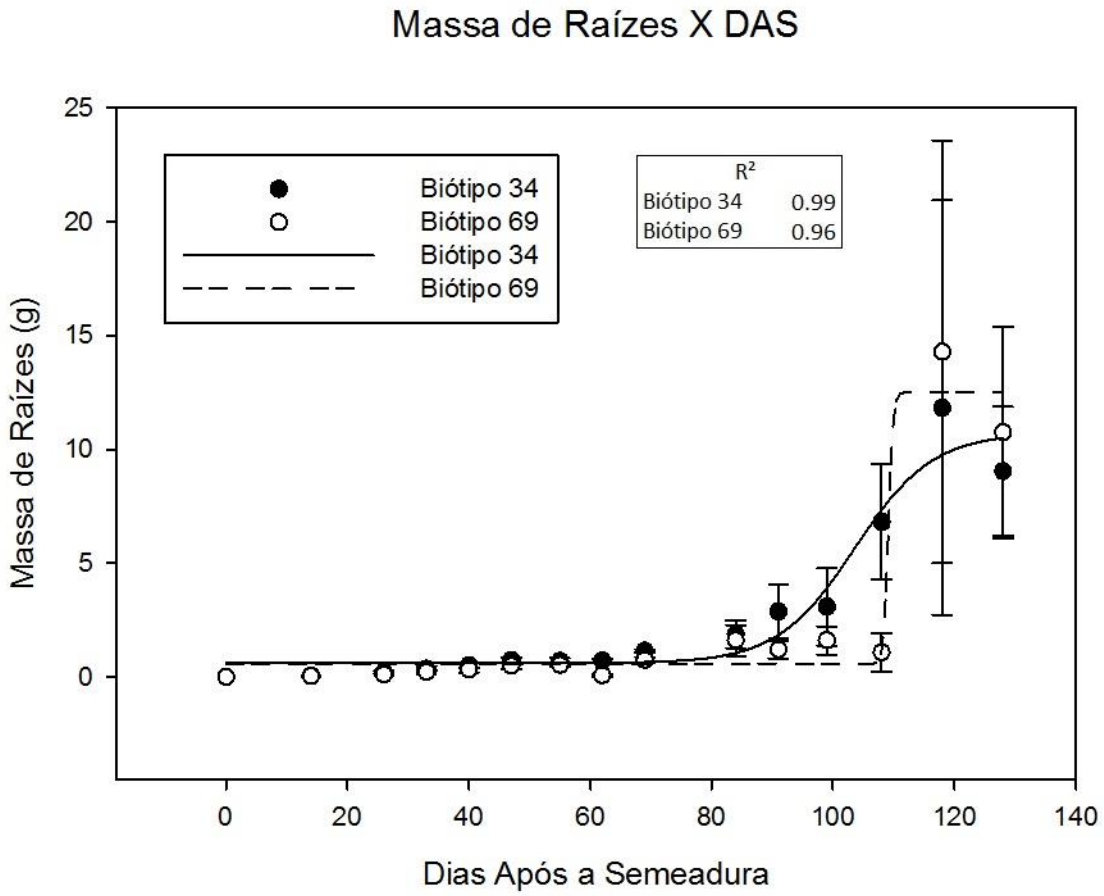

Figura 4.4 – Evolução da massa seca das raízes dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, 2013-2014

$$f = \frac{0.60 + 10.11}{1 + (\exp\left(-\frac{x - 103.62}{6.39}\right)} \tag{4.7}$$

$$f = \frac{0.57 + 11.93}{1 + (\exp(-\frac{x - 109.17}{0.37})} \tag{4.8}$$

Diferentemente do observado neste trabalho, Moreira et al. (2010) observaram diferenças significativas no desenvolvimento do sistema radicular tanto de biótipos de *Conyza bonariensis* quanto de *Conyza canadenses* resistentes ao glyphosate, de forma que os biótipos suscetíveis tiveram a habilidade de acumular quase duas vezes maior massa seca nas raízes do que os biótipos resistentes. Por outro lado, Melo (2011) não observou diferenças de crescimento em biótipos de *Digitaria insularis* resistente e suscetível ao glyphosate.

O gráfico presente na Figura 4.5 ilustra o desenvolvimento dos biótipos como um todo ao longo dos dias após a semeadura, obtido pelo somatório da massa de colmos, massa de raízes e massa dos limbos foliares, que foram avaliados separadamente. Indiferente das demais avaliações, o biótipo 34S teve crescimento médio superior ao biótipo 69R, porém não foi possível afirmar estatisticamente que seus crescimentos foram diferentes. Ao final do ciclo, o biótipo 69R obteve maior acúmulo de massa seca que o biótipo 34S, porém ambos foram estatisticamente iguais devido à variação das parcelas experimentais. As curvas foram ajustadas ao modelo sigmoide com quatro parâmetros, e as equações 4.9 e 4.10 são disponibilizadas a seguir. O alto coeficiente de determinação indica bom ajuste dos dados à curva escolhida.

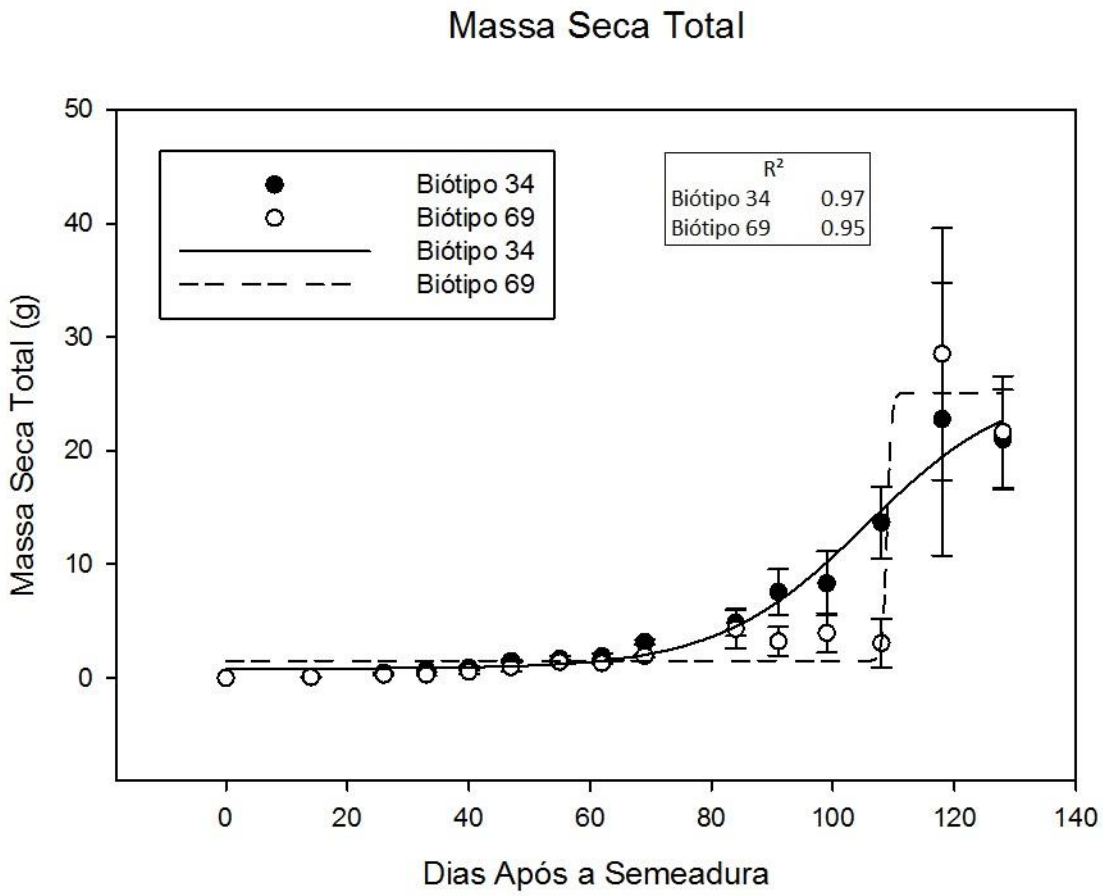

Figura 4.5 – Evolução da massa seca total dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, 2013-2014

$$f = \frac{0.83 + 25.35}{1 + (\exp(-\frac{x - 105.56}{12.22})} \tag{4.9}$$

$$f = \frac{1.53 + 23.55}{1 + (\exp(-\frac{x - 108.95}{0.35})} \tag{4.10}$$

Por fim, a taxa de crescimento absoluto, presente na Figura 4.6, pode ser usada como explicação para todas as outras avaliações, uma vez que esta expressa o quanto as plantas acumulam de massa seca por dia. Nota-se que o biótipo 69R nas últimas semanas de ciclo aumentou sua taxa de crescimento absoluto, fazendo com que a média de sua massa final fosse maior que a do biótipo 34S, enquanto que este último manteve um crescimento constante até o fim do ciclo, com leve aumento da taxa de crescimento absoluto nas últimas semanas. Por fim, a última avaliação de crescimento mostrou um crescimento negativo,

indicando que a massa seca da avaliação anterior foi maior que a massa seca atual, evidenciando que a planta iniciou seu estádio de senescência. As curvas de crescimento absoluto foram do tipo pico de Gauss, com quatro parâmetros, como são mostradas nas equações 4.11 e 4.12.

Ahmadi et al. (1980) verificaram que a absorção do glyphosate marcado em *Echinochloa crus-galli* reduzia em 11% quando as plantas eram tratadas com 15cm de altura, comparado com o tamanho de 10cm e, além da absorção, a translocação também era reduzida significativamente. Dias et al. (2013) concluíram que a trapoeraba (*Commelina benghalensis*) torna-se quatro vezes mais tolerante ao glyphosate a cada dez unidades de desenvolvimento na escala BBCH (HESS et al., 2007). Autores enfatizam que o controle de plantas daninhas em pós-emergência deve ser baseado no estádio de crescimento em que elas se encontram (ASKEW et al., 2000; JOHNSON; HOVERSTAD, 2002; FLERK et al., 2008). Independentemente de que o biótipo 69R possua crescimento inicial mais lento que o 34S, as implicações do manejo são mínimas, uma vez que o controle de plantas daninhas deve ser realizado quando as plantas estão nos estádios iniciais de controle, e se possível com a associação de herbicidas com mecanismos de ação alternativos ao mecanismo de ação do glyphosate, como os inibidores da ACCase e manejo com pré-emergentes.

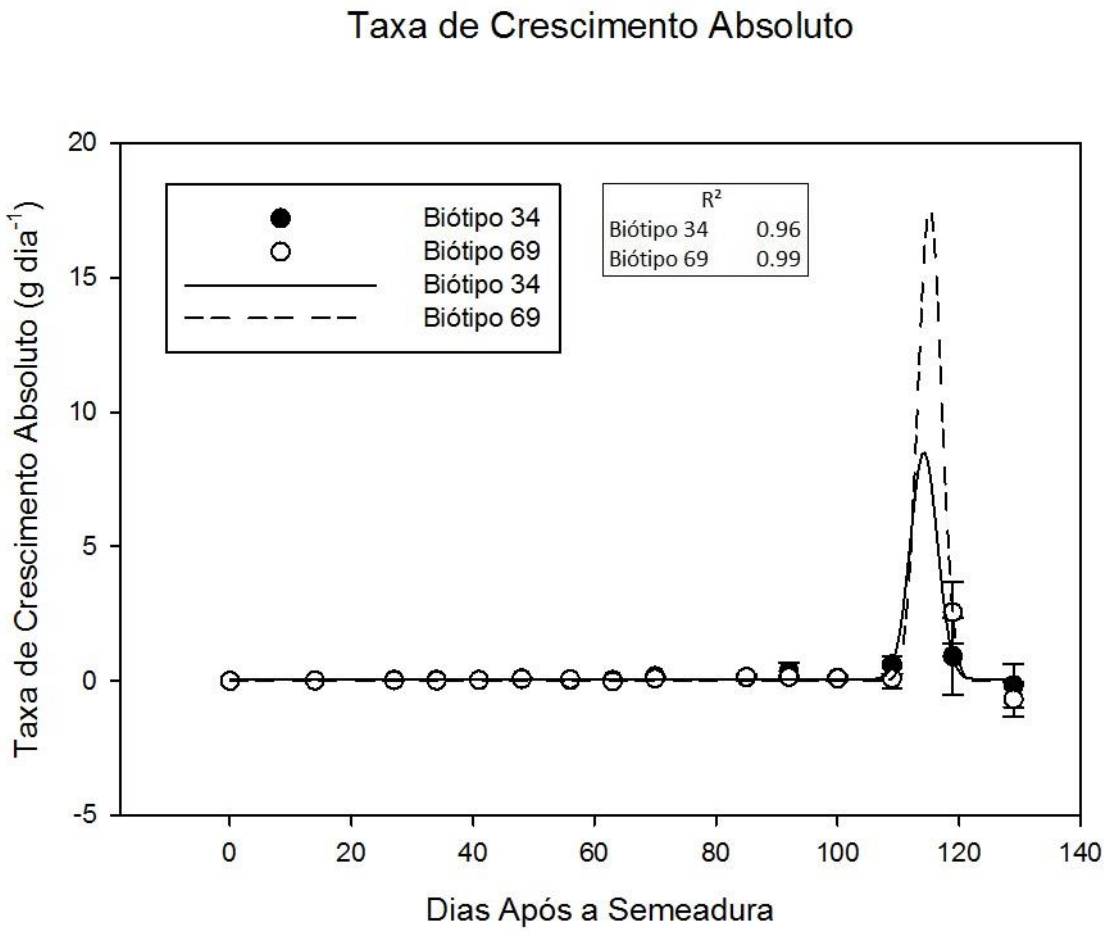

Figura 4.6 – Evolução da massa seca total dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, 2013-2014

$$f = (0.06) + 8.44 * \exp(-0.5 * ((x - 114.23)/2.22)^2) \quad (4.11)$$

$$f = (-0.004) + 17.72 * \exp(-0.5 * ((x - 115.21)/1.92)^2) \quad (4.12)$$

Tabela 4.1 – Resultado dos testes t-student realizados para cada avaliação. Piracicaba, 2013 – 2014

DAS	Área Foliar	Massa de Folhas	Massa de Raízes	Massa de Colmos	Massa Seca Total	Taxa de Crescimento Absoluto
0	-	-	-	-	-	-
14	0,003*	0,046*	0,423^{ns}	1,000^{ns}	0,104^{ns}	0,104 ^{ns}
27	0,003*	0,593^{ns}	0,097^{ns}	0,019*	0,022*	0,042*
34	0,001*	0,231^{ns}	0,028*	0,115^{ns}	0,023*	0,219 ^{ns}
41	0,025*	0,539^{ns}	0,045*	0,574^{ns}	0,063^{ns}	0,463 ^{ns}
48	0,002*	0,073^{ns}	0,005*	0,921^{ns}	0,081^{ns}	0,477 ^{ns}
56	0,007*	0,421^{ns}	0,205^{ns}	0,933^{ns}	0,217^{ns}	0,214 ^{ns}
63	0,001*	0,015*	0,082^{ns}	0,154^{ns}	0,018*	0,110 ^{ns}
70	0,005*	0,018*	0,003*	0,001*	0,002*	0,003*
85	0,000*	0,486^{ns}	0,191^{ns}	0,511^{ns}	0,357^{ns}	0,845 ^{ns}
92	0,006*	0,043*	0,087^{ns}	0,078^{ns}	0,042*	0,045*
100	0,003*	0,022*	0,246^{ns}	0,086^{ns}	0,096^{ns}	0,990 ^{ns}
109	0,013*	0,005*	0,012*	0,004*	0,004*	0,014*
119	0,281^{ns}	0,581^{ns}	0,748^{ns}	0,323^{ns}	0,604^{ns}	0,213 ^{ns}
129	0,331^{ns}	0,388^{ns}	0,561^{ns}	0,958^{ns}	0,859^{ns}	0,495 ^{ns}

*Significativo ao teste t-student a 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo ao teste t-student a 5% de probabilidade

Segundo Gressel e Segel (1990) e Richter et al. (2002), estudos como o desenvolvido nesta pesquisa são úteis no desenvolvimento de modelos matemáticos que simulam o aparecimento da resistência a herbicidas e impacto na dinâmica populacional.

4.4 Conclusões

Não foi possível inferir de forma clara que existe um diferencial de crescimento entre os biótipos resistentes e suscetível de capim-branco que implicaria em custo adaptativo do biótipo resistente.

Nas fases iniciais de crescimento, na maioria das variáveis analisadas, o biótipo 34S foi superior ou estatisticamente igual ao biótipo 69R até o fim de seu ciclo. Esta diferenciação de crescimento durante as fases de crescimento da planta daninha pode ter implicações na dinâmica populacional e manejo da planta daninha que deve ser explorada em futuras pesquisas.

Referências

AHMADI, M.S.; HADERLIE, L.C.; WICKS, G.A. Effect of growth stage and water stress on Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control and on glyphosate absorption and translocation. **Weed Science**, Lawrence, v. 28, p. 277-282, 1980.

ANTONOVICS, J.; THRALL, P.H. Cost of resistance and the maintenance of genetic-polymorphism in host–pathogen systems. **Proceedings of the Royal Society of London.** Series B: Biological Sciences, London, v. 257, p. 105–110, 1994.

ASHIGH, J.; TARDIF, F.J. An Ala205Val substitution in acetohydroxyacid synthase of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science,** Lawrence, v. 55, p. 558–565, 2007.

ASKEW, S.D.; SHAW, D.R.; STREET, J.E. Graminicide application timing influences red rice (*Oryza sativa*) control and seedhead reduction in soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 14, p. 176-181, 2000.

BECKIE, H. J. Herbicide resistant weed management: focus on glyphosate. **Pest Management Science**, Malden, v. 67, p. 1037-1048, 2011.

BOUTSALIS, P.J.; KAROTAM, J.; POWLES, S.B. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. **Pesticides Science**, Malden, v. 55 p. 507–516, 1999.

BRADSHAW, L.D.; PADGETTE, S.R.; KIMBALL, S.L.; WELLS, B.H.Perspectives on glyphosate resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, p. 189–198, 1997.

CALBO, A.G.; SILVA, W.L.C.; TORRES, A.C. Comparação de modelos e estratégias para análise de crescimento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 1, p. 1-7, 1989.

CARVALHO, S.J.P.; PEREIRA SILVA, R.F.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento, desenvolvimento e produção de sementes da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, p. 603-609, 2005.

CAUSTON, D.R.; ELIAS, C.O.; HARDLEY, P. Biometrical studies of plant growth. I. The Richard function, and its application in analyzing the effects of temperature on leaf growth. **Plant Cell Environment**, Malden, v. 1, p. 163-184, 1978.

CHAPIN, F.S.; AUTUMN, K.; PUGNAIRE, F. Evolution of suites of traits in response to environmental-stress. **The American Naturalist**, Chicago, v. 142, p. 78–92, 1993.

CHEVILLON, C.; PASTEUR, N.; MARQUINE, M.; HEYSE, D.; RAYMOND, M. Population-structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. **Evolution**, Malden, v. 49, p. 997–1007, 1995.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; WESTRA, P.; MOORE III, F. Growth analysis of sulfonylrea-resistant and –susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, Lawrence, v. 45, p. 691-695, 1997.

COHAN, F.M.; KING, E.C.; ZAWADZKI, P. Amelioration of the deleterious pleiotropic effects of an adaptive mutation in *Bacillus subtilis*. **Evolution**, Malden, v. 48, p. 81–95, 1994.

COLEY, P.D.; BRYANT, J.P. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, Washington, v. 230, p. 895–899, 1985.

DAVIS, V.M.; GIBSON, K.D.; MOCK, V.A.; JOHNSON, W.G. In-field and soil related factors that affect the presence and prediction of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) populations collected from Indiana soybean fields. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 281-289, 2009.

DÉLYE, C.; ZHANG, X.Q.; MICHEL, S.; MATEJUCEK, A.; POWLES, S.B. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme-A carboxylase inhibitors in blackgrass. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 137, p. 794–806, 2005.

DIAS, A.C.R.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Fenologia da trapoeraba como indicador para tolerância ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, p. 185-191, 2013.

EBERLEIN, C.V.; GUTTIERI, M.J.; BERGER, P.H.; FELLMAN, J.K.; MALLORY-SMITH, C.A. Physiological consequence of mutation for ALS-inhibitor resistance. **Weed Science**, Lawrence, v. 47, p. 383–392, 1999.

EBERLEIN, C.V.; GUTTIERI, M.J.; MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; BAERG, R.J. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science,** Lawrence, v. 45, p. 212–217, 1997.

FLECK, N.G.; LAZAROTO, C.A.; SCHAEDLER, C.E.; FERREIRA, F.B. Controle de papuã (*Brachiaria plantaginea*) em soja em função da dose e da época de aplicação do herbicida clethodim. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, p. 375-383, 2008.

GIACOMINI, D.; WESTRA, P.; WARD, S.M. Impact of genetic background in fitness cost studies: an example from glyphosate-resistant Palmer Amaranth. **Weed Science**, Lawrence, v. 62, p. 29-37, 2014.

GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. Modeling the effectiveness of herbicide resistance and mixtures as strategies to delay or preclude resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. l 4, p. 186–198, 1990.

GROETERS, F.R.; TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution,** Malden, v. 48, p. 197–201, 1994.

HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**, Stony Brook, v. 67, p. 283–335, 1992.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale – general for descriptions pf the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, p. 433-441, 1997.

JASIENIUK, M.; BRULÉ-BABEL, A.L.; MORRISON, N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, Lawrence, v. 44, p. 176–193, 1996.

JOHNSON, G.A.; HOVERSTAD, T.R. Effect of row spacing and herbicide application timing on weed control and grain yield in corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 16, p. 548-553, 2002.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate.** 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MOREIRA, M.S.; MELO, M.S.C.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento diferencial de biótipos de *Conyza* spp. resistente e suscetível ao herbicida glifosato. **Bragantia**, Campinas, v. 69, p. 591-598, 2010.

NEVE, P.; DIGGLE, A.J.; SMITH, F.P.; POWLES, S.B. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* I: population biology of a rare resistance trait. **Weed Research**, Oxford, v. 43, p. 404–417, 2003.

PEDERSEN, B.P.; NEVE, P.; ANDREASEN, C.; POWLES, S.B. Ecological fitness of a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population: growth and seed production along a competition gradient. **Basic and Applied Ecology**, Gottingen, v. 8, p. 258–268, 2007.

POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 20, p. 282– 289, 2006.

POWLES, S.B.; SHANER, D.L. **Herbicide resistance and world grains.** Boca Raton: CRC Press, 2001. 328 p.

PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate-synthase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, Oxford, v. 88, p. 8–13, 2002.

PRESTON, C.; STONE, L.M.; RIEGER, M.A.; BAKER, J. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, Massachusetts, v. 84, p. 227-235, 2006.

PRESTON, C.; WAKELIN, A.M.; DOLMAN, F.C.; BOSTAMAM, Y.; BOUTSALIS, P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 435-441, 2009.

PURRINGTON, C.A. Costs of resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 3, p. 305–308, 2000.

RICHTER, O.; ZWERGER, P.; BOTTCHER, U. Modeling spatiotemporal dynamics of herbicide resistance. **Weed Research**, Oxford, v. 42, p. 52–64, 2002.

SALZMANN, D.; HANDLEY, R.J.; MUELLER-SCHARER, H. Functional significance of triazine-herbicide resistance in defence of *Senecio vulgaris* against a rust fungus. **Basic Applied Ecology**, Gottinger, v. 9, p. 577-587, 2008.

SHRESTHA, A.; HANSON, B.D.; FIDELIBUS, M.W.; ALCORTA, M. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. **Weed Science,** Lawrence, v. 58, p. 147–153, 2010.

SIMARMATA, M.; BUGHARA, S.; PENNER, D. Inheritance of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. **Weed Science,** Lawrence, v. 53, p. 615–619, 2005.

STRAUSS, S.Y.; RUDGERS, J.A.; LAU, J.A.; IRWIN, R.E. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 17, p. 278–285, 2002.

TIAN, D.; TRAW, M.B.; CHEN, J.Q.; KREITMAN, M.; BERGELSON, J. Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 423, p. 74–77, 2003.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Lawrence, v. 50, p. 700–712, 2002.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plantas. **New Phytologist**, Lancaster, v. 184, p. 751-767, 2009.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 5, p. 116–123, 2000.

YU, Q.; CAIRNS, A.; POWLES, S.B. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta,** Berkeley, v. 225, p. 499–513, 2007.

YU, Q.; NELSON, J.K.; ZHENG, M.Q.; JACKSON, M.; POWLES, S.B. Molecular characterization of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. **Pest Management Science,** Malden, v. 63, p. 918-927, 2007.

YU, Q.; ZHANG, X.Q.; HASHEM, A.; WALSH, M.J.; POWLES, S.B. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science,** Lawrence, v. 51, p. 831-838, 2003.

ZELAYA, I.A.; OWEN, D.M.K. Differential response of *Amaranthus tuberculatus* (Moq ex DC) JD Sauer to glyphosate. **Pest Management Science**, Malden, v. 61, p. 936–950, 2005.

ZELAYA, I.A.; OWEN, M.D.K.; VANGESSEL, M.J. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. **Theoretical and Applied Genetics,** Stuttgart, v. 110**,** p. 58–70, 2004.

5 CONTROLE DA PLANTA DANINHA CAPIM-BRANCO (*Chloris polydactyla*) ATRAVÉS DE HERBICIDAS ALTERNATIVOS AO GLYPHOSATE

Resumo

O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia de controle dos biótipos de capim-branco 34S e 69R, tanto na pós-emergência quanto na pré-emergência. Para isso foram conduzidos ensaios em condições de casa de vegetação, sendo avaliada visualmente a porcentagem de controle e a massa fresca dos biótipos resistentes e suscetível de capim-branco (*Chloris polydactila*) em função da aplicação dos herbicidas glufosinate, sethoxydim, quizalofop-P-ethyl, tepraloxydim, haloxyfop-P-methyl, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl, tembotrione, paraquat, saflufenacil e MSMA na modalidade de aplicação em condições de pós-emergência e dos herbicidas amicarbazone, chlorimuron-ethyl, clomazone, diclosulan, imazethapyr, s-metolachlor, sulfentrazone, hexazinone, isoxaflutole, metribuzin e tebuthiuron em condições de pré-emergência. Não foi possível estabelecer uma relação entre diferenças de suscetibilidade entre os biótipos, dessa forma, a resistência do biótipo resistente (69R) ao glyphosate não alterou sua suscetibilidade aos herbicidas alternativos ao glyphosate aqui estudados. A avaliação de massa fresca dos tratamentos em pós-emergência mostrou que os herbicidas que melhor controlaram o biótipo 34S foram clethodim, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione. Já o biótipo 69R foi controlado pelos herbicidas clethodim, haloxifop-P-methyl, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione. Em relação à massa fresca dos tratamentos em pré-emergência, os biótipos 34S e 69R foram controlados eficientemente por todos os tratamentos.

Palavras-chave: Capim-branco; Biótipos resistentes; Controle químico

Abstract

The objective of the research was to evaluate the efficacy of control of the biotypes 34S and 69R, in both post-emergence and pre-emergence conditions. Visual control and fresh weight of the resistant and susceptible biotypes of *Chloris polydactyla,* as a function of treatments with the herbicides glufosinate, sethoxydim, quizalofop-P-ethyl, tepraloxydim, haloxyfop-P-methyl, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl, tembotrione, paraquat, saflufenacil and MSMA in post-emergence conditions, and at pre-emergence were evaluated amicarbazone, chlorimuron-ethyl, clomazone, diclosulan, imazethapyr, s-metolachlor, sulfentrazone, hexazinone, isoxaflutole, tebuthiuron and metribuzin. It was not possible to establish a statistical difference in susceptibility between the biotypes. The fresh weight resulted from the post-emergence treatments showed that the herbicides which best controlled the 34S biotype were clethodim, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl and tembotrione. The biotype 69R was effectively controlled by the herbicides clethodim, haloxyfop-P-methyl, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl and tembotrione. Regarding the fresh weight from pre-emergence treatments, the biotypes 34S and 69R were controlled effectively by all treatments.

Keywords: Tall windmill grass; Resistant biotypes; Chemical control

5.1 Introdução

O capim branco era considerado uma planta daninha secundária nas infestações, no entanto, nos últimos anos, tem atingido grau de importância muito significativo nas

comunidades infestantes, principalmente da cultura de soja e citros. Sua infestação tardia nas lavouras de grãos e fibras obriga os produtores à adoção de manejos em condições de pós-emergência da planta daninha, onde em um sistema agrícola baseado em culturas resistentes ao glyphosate, o produtor se tornou altamente dependente deste herbicida.

Powles e Yu (2010) relatam que nos últimos 45 anos, modernas moléculas de herbicidas tem substituindo a força humana, animal e mecânica na remoção das plantas daninhas das lavouras, o que possibilitou o aumento da produtividade global de alimentos. Os autores também fazem um paralelo interessante sobre a relação dos herbicidas e plantas daninhas, ressaltando que o emprego de antibióticos não conseguiu eliminar as doenças causadas por microrganismos em animais e seres humanos, tampouco o emprego de inseticidas e fungicidas eliminaram as pragas e doenças agrícolas; a aplicação dos herbicidas também não conseguiu eliminar as plantas daninhas do cenário agrícola, uma vez que forças evolucionárias atuando sobre a diversidade genética em extensas populações explica a sobrevivência de indivíduos após eventos catastróficos como a aplicação de herbicidas sobre vastas áreas.

Na década passada ocorreu uma revolução mundial na maneira como se produzia alimentos, graças ao advento e ampla adoção de culturas geneticamente modificadas (POWLES; YU, 2010), com destaque para soja, milho e algodão resistente ao herbicida glyphosate. Este fenômeno resultou na extrema dependência na agricultura, em alguns países, do glyphosate como principal forma de manejo das plantas daninhas.

A dependência do glyphosate desestimulou as pesquisas na descoberta de novas moléculas de herbicidas. Porém, a alta pressão de seleção imposta pelo uso do glyphosate selecionou diversos biótipos de espécies de plantas daninhas resistentes no mundo (HEAP, 2013). No Brasil, safra 2012/2013, 91,1% da soja cultivada no país era resultante de eventos isolados de resistência a herbicidas (84,6%), quanto de eventos múltiplos de resistência a insetos e herbicidas (6,5%). Já para a cultura do milho (safra e “safrinha”) correspondeu a 41,2% de toda a área cultivada no Brasil, e para a cultura do algodão, 30,7% da área cultivada (CÉLERES CONSULTORIA, 2013).

Na safra de 2010/2011, segundo Adegas et al. (2012), o número de aplicações média de glyphosate por ciclo da cultura de soja foi de 2,4, onde a dose média foi de 1.584 g e.a.ha^{-1}. Desse total de aplicações, apenas 64,1% teve a adição de outro ingrediente ativo,

exemplificando a alta dependência do glyphosate no sistema de produção e a baixa adoção de medidas preventivas à seleção de plantas daninhas resistentes ao glyphosate.

Culturas agrícolas perenes e semi-perenes, assim como as culturas anuais, também tem alta dependência do glyphosate no controle de plantas daninhas. Pomares cítricos, plantações de café e frutíferas arbustivas, em geral, têm no glyphosate a principal forma de manejo da vegetação, com o herbicida sendo aplicado na forma de jato-dirigido à entrelinha da culura. Segundo Pitelli (2004), Matheis et al. (2006) e Pinotti et al. (2009), em média são três a quatro entradas anuais na cultura do citros com a finalidade de aplicação de glyphosate, em doses que variam de 720 a 1.440 g e.a. ha^{-1}.

Por outro lado, o glyphosate é um herbicida que não deve ser retirado do sistema de produção uma vez que controla de forma ampla o complexo de plantas daninhas na área, ou seja, tem amplo espectro de ação, além de toxicologia favorável ao meio ambiente e aos seres vivos.

No Brasil, foram identificados biótipos de buva [*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist] (VARGAS et al., 2007), voadeira [*Conyza canadensis* (L.) Cronquist] (LAMEGO; VIDAL, 2008; MOREIRA et al., 2007), avoadinha [*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker] (SANTOS, et al., 2012), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2004; RIBEIRO, 2008) e capim-amargoso [*Digitaria insularis* (L.) Fedde] (CARVALHO et al., 2011; MELO, 2011) como sendo resistentes ao glyphosate. Nos Estados Unidos da América, a ocorrência de biótipos resistentes de buva (*Conyza canadensis*) resulta no aumento do custo de produção da soja em US$ 28,42 ha^{-1} (MUELLER et al., 2005). Já para controlar o *Amaranthus rudis* resistente ao glyphosate, o aumento do custo de produção da soja pode chegar a US$ 48,00 ha^{-1} em Missouri (LEGLEITER; BRADLEY; MASSEY, 2009).

Nesse cenário, é imprescindível que novas medidas de controle sejam desenvolvidas. Na realidade, a palavra “nova” não é totalmente correta nesse contexto, podendo ser substituída por “esquecidas no passado”, como a utilização de herbicidas pré-emergentes na pré-semeadura/semeadura das culturas anuais, associação de herbicidas para a dessecação e utilização de herbicidas seletivos alternativos e/ou associados ao glyphosate, mesmo quando da adoção de culturas geneticamente modificadas para a resistência ao glyphosate. De modo geral, para evitar o surgimento de espécies resistentes em uma área agrícola é necessária a redução da pressão de seleção na população por meio de práticas agrícolas como rotação de culturas, rotação de herbicidas, associação de ingredientes ativos de diferentes mecanismos de

ação, e tudo isso de nada adianta se não forem práticas coletivas e em conjunto com os agricultores da região, uma vez que certas espécies de plantas daninhas possuem sementes que são dispersas por muitos quilômetros (INOUE; OLIVEIRA JR., 2011).

Para exemplificar, Lamego et al. (2013) compararam o controle de buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate sob diferentes coberturas do solo durante o inverno, e concluiram que a utilização de nabo e ervilhaca são eficientes medidas de manejo dessa espécie quando existe a associação do glyphosate com outros herbicidas como o 2,4-D e o chlorimuron-ethyl, complementados com uma aplicação de herbicida de contato próxima à semeadura da soja, como o paraquat + diuron.

Johnson et al. (2012) estudaram diversas táticas visando reduzir a pressão de seleção sobre plantas daninhas em área semeada com soja transgênica para a resistência ao glyphosate, e concluíram que a aplicação de herbicidas em pré-emergência das plantas daninhas e da cultura seguidos por uma aplicação de glyphosate resultaram nos melhores tratamentos para o controle de plantas daninhas de folha larga (*Chenopodium album, Amaranthus rudis* e *Ambrosia trifida*) e não constataram redução na produtividade da cultura.

O azevém, espécie que possui biótipos resistentes ao glyphosate em diversas localidades do sul e sudeste do Brasil, foi estudado em casa-de-vegetação por Christoffoleti et al. (2004) quanto a alternativas químicas de controle desses biótipos. Foi relacionado seu estádio vegetativo com a suscetibilidade ao glyphosate e foi notado que quanto mais avançado o estádio de crescimento, mais difícil era o controle. Independentemente do estádio vegetativo, os herbicidas paraquate + diurom e glyphosate + cletodim foram eficientes em todos os estádios vegetativos analisados (duas a três folhas, início do perfilhamento, de 12 perfilhos até o florescimento e início do florescimento).

Aplicações sequenciais também são alternativas de manejo em áreas tanto de culturas perenes quanto para culturas anuais geneticamente modificadas. Melo et al. (2012) estudaram alternativas químicas para controlar o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente e suscetível ao glyphosate em campos de citros, e chegaram a conclusão que os tratamentos glyphosate + paraquat seguido por uma aplicação de paraquat + diuron sete dias após a primeira aplicação e o tratamento glyphosate + clethodim seguido por uma aplicação de amônio-glufosinato sete dias após a primeira aplicação foram os melhores resultados, sem causar injúrias às plantas de citros.

Em um estudo realizado nos Estados Unidos da América do Norte com mais de 1.000 agricultores, que cultivam milho, algodão e soja, Frisvold et al. (2009) publicaram que o uso de múltiplos herbicidas com diferentes mecanismos de ação era a prática menos adotada no manejo da resistência, apesar de ser a prática mais difundida entre os especialistas em plantas daninhas. Os relatos mais comuns dos agricultores dos porquês eles não adotavam essa técnica eram os seguintes: (i) alguns produtores acreditam que o uso de mais de um herbicida com mecanismo de ação diferentes aumentava o custo de produção e o controle de plantas daninhas resistentes era incerto (HURTLEY; MITCHLL; FRISVOLD, 2009); (ii) alguns agricultores acreditam que controlar plantas daninhas resistentes está além de suas capacidades (WILSON et al., 2008); (iii) outros agricultores acreditam que a indústria criará novos herbicidas capazes de controlar biótipos resistentes (LLEWELLYN , 2007).

O capim-branco, como está sendo demonstrado cientificamente neste trabalho de pesquisa, possui biótipos que tem a habilidade de sobreviver à aplicação de doses recomendadas do herbicida glyphosate. Portanto, torna-se necessário pesquisar a eficácia de herbicidas alternativos ao glyphosate para controlar o capim-branco, uma vez que o glyphosate isoladamente não é mais uma alternativa viável para alguns biótipos. Além disso, é necessário constatar se o fato de alguns biótipos do capim-branco terem sofrido pressão de seleção e mudanças nas características genéticas pode ter alterado a suscetibilidade a herbicidas com outros mecanismos de ação. Nesse contexto, foi desenvolvido o presente trabalho com a finalidade de estudar herbicidas alternativos ao glyphosate que sejam eficazes para controlar os biótipos resistente e suscetível do capim-branco.

5.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação do departamento de produção vegetal da ESALQ/USP, com irrigação diária de aproximadamente 4 mm distribuídos durante o dia, no período de Dezembro a Março, 2013-2014. Para esse experimento, foram estudadas as populações de número 34S e 69R, onde a 34S foi a população considerada como suscetível de acordo com o experimento de confirmação da resistência, e a população 69R foi considerada a população com o maior fator de resistência entre as populações estudadas. Suas sementes foram obtidas por meio da geração F2 e semeadas em substrato comercial, devidamente e igualmente adubados para em seguida, quando as plantas atingiram o estádio de três folhas totalmente expandidas, foram

transplantados para vasos preenchidos com solo cujas características químicas estão apresentadas na Tabela 4.1 e físicas na Tabela 4.2. Foi deixada uma planta por vaso no momento da aplicação dos tratamentos herbicida.

Tabela 5.1 – Características químicas do solo utilizado no experimento de alternativas de controle. Piracicaba, 2013-2014

Profundidade (cm)	**pH $CaCl_2$**	**M.O. g dm^{-3}**	**P mg dm^{-3}**	**K**	**Ca**	**Mg**	**SB**	**CTC**	**V**
				$mmol_c$ dm^{-3}					
0-20	6,4	14	17	3,0	48	18	69,1	87,2	79

Fonte: Departamento de Ciências do Solo. ESALQ/USP

Tabela 5.2 – Propriedades físicas do solo utilizado no experimento de alternativas de controle (em g kg^{-1}). Piracicaba, 2013-2014

Profundidade (cm)	**Areia**	**Silte**	**Argila**	**Classe textural**	**Origem**
0-20	305	123	572	Argiloso	Piracicaba

Fonte: Departamento de Ciências do Solo. ESALQ/USP

Quando as plantas atingiram o estádio 23, segundo a escala de Hess, et al (1997), os tratamentos, que constam na Tabela 5.3, foram aplicados com um pulverizador costal, trabalhando a 2,0 bar, equipado com ponta Teejet 110.02 do tipo leque, calibrado para aplicar um volume de calda correspondente a 200 L ha^{-1}, e devolvidos à casa-de-vegetação para posteriores avaliações.

Tabela 5.3 – Tratamentos herbicida aplicados em condições de pós-emergência do capim branco com suas respectivas doses, adjuvantes e mecanismos de ação. Piracicaba, 2013-2014

Tratamentos*	**Dose (g i.a. ha^{-1} ou g e.a. ha^{-1})****	**Adjuvante*** (Concentração v/v)**	**Mecanismo de Ação**
1 – Testemunha	0	-	-
2 – Glufosinate de amônio	400	0,5 %	Inibidor da GS
3 – Sethoxydim	230	1 %	Inibidor da ACCase
4 – Clethodim	120	1 %	Inibidor da ACCase
5 – Quizalofop-P-ethyl	180	2 %	Inibidor da ACCase
6 – Tepraloxydim	100	0,5 %	Inibidor da ACCase
7 – Haloxyfop-P-methyl	60	0,5 %	Inibidor da ACCase
8 – Glyphosate	4800	2 %	Inibidor da EPSPs
9 – Fenoxaprop-P-Ethyl	88	1 %	Inibidor da ACCase
10 – Tembotrione	75,6	0,5 %	Inibidor da HPPD
11 – Paraquat	400	2 %	Inibidor do FS I
12 – Saflufenacil	100	2 %	Inibidor da PROTOX
13 – MSMA	1.422	1 %	Desconhecido

*Ingrediente ativo. **Doses em gramas de ingrediente ativo por hectare ou gramas de equivalente ácido por hectare.***Adição de óleo mineral (adjuvante) segundo recomendação em bula.

No total, foram aplicados 13 tratamentos em condições de pós-emergência e 13 tratamentos em pré-emergência (Tabela 5.3 e 5.4) na quantidade de quatro repetições por tratamento no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. A escolha dos herbicidas foi baseada nas moléculas que recentemente vem sendo as mais utilizadas na cultura da soja, milho, citros e cana-de-açúcar, bem como moléculas que, por experiência prática, teriam potencial de controle eficaz do capim-branco.

Tabela 5.4 – Tratamentos herbicida aplicados em condições de pré-emergência do capim branco com suas respectivas doses e mecanismos de ação. Piracicaba, 2013-2014

Tratamentos*	**Dose (g i.a. ha^{-1})****	**Mecanismo de Ação**
1 – Testemunha	-	-
2 – Amicarbazone	1400	Inibidor do FS II
3 – Chlorimuron-ethyl	80	Inibidor da ALS
4 – Clomazone	720	Inibidor da síntese de carotenóides
5 – Diclosulan	29.8	Inibidor da ALS
6 – Imazethapyr	100	Inibidor da ALS
7 – S-metolachlor	1440	Inibidor da síntese de ácidos graxos de cadeia longa
8 – Sulfentrazone	500	Inibidor da PROTOX
9 – Hexazinone	350	Inibidor do FS II
10 – Isoxaflutole	100	Inibidor da HPPD
11 – Metribuzin	480	Inibidor do FS II
12 – Diuron + Hexazinone	936 + 264	Inibidor do FS II
13 - Tebuthiuron	1200	Inibidor do FS II

*Ingrediente ativo.**Doses em gramas de ingrediente ativo por hectare.

As avaliações foram realizadas aos 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a aplicação dos tratamentos, segundo recomendações da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas - SBCPD (1995), onde foi utilizada a escala da ALAM (1974). Aos 35 dias após o tratamento, as plantas foram colhidas com uma tesoura de poda na superfície do solo e pesadas logo em seguida, para a avaliação de fitomassa fresca.

A análise estatística foi realizada através do software SAS. Os dados obtidos foram verificados quanto à normalidade dos resíduos, variância, e, em seguida, foi realizado o teste de comparações múltiplas pela média dos tratamentos (Tukey), a 5% de probabilidade. Também foi necessária a transformação dos dados de massa fresca dos tratamentos feitos em condições de pré-emergência, por meio da seguinte fórmula: $Y = (x + 0,5)^{0.5}$, onde “Y” é o valor final da parcela experimental e “x” é o valor real da variável medida na parcela experimental.

5.3 Resultados e Discussão

De acordo com a análise da variância (ANOVA), para todas as avaliações (visual em pré e pós-emergência e massa fresca em pré e pós-emergência) houve interação significativa entre os fatores tratamento e biótipo. Os resultados do teste de comparação de médias (Tukey, $p<0,05$), referentes ao controle visual em pós-emergência aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, são apresentados na Tabela 5.5.

Através dos resultados das avaliações finais, é possível observar que houve diferença estatística no controle dos biótipos, sendo que não foi possível estabelecer um padrão para a diferença de suscetibilidade entre os biótipos a partir das avaliações de controle visual aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos. Para exemplificar, dos 12 tratamentos que tiveram aplicação de herbicida, três controlaram melhor o biótipo 34S, cinco controlaram melhor o biótipo 69R e quatro tratamentos tiveram controle estatisticamente igual.

Os tratamentos que melhor controlaram o biótipo 34S, baseados no controle visual, foram os contendo os herbicidas glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione, enquanto que os que melhor controlaram o biótipo 69R foram os tratamentos compostos pelos herbicidas haloxyfop-P-methyl, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione.

Os tratamentos paraquat e glufosinate proporcionaram controle inicial satisfatório até os 14 dias após a aplicação. Entretanto, assim como observado por Melo et al. (2012) em relação ao capim-amargoso, esses tratamentos permitiram a recuperação das plantas tratadas nas avaliações seguintes, uma vez que esses herbicidas possuem ação de contato/pouca translocação para as partes de reserva, destruindo principalmente a parte aérea das plantas daninhas.

Tabela 5.5 - Controle Visual* aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos aplicados em condições de pós-emergência. Piracicaba, 2013-2014

Tratamento	Biótipo 34S	Biótipo 69R
1 – Testemunha	0,00 f A	0,00 g A
2 – Glufosinate	2,50 f A	8,75 g B
3 – Sethoxydim	27,50 d A	21,25 f A
4 – Clethodim	82,50 b B	63,75 d A
5 – Quizalofop-P-ethyl	30,00 d A	46,25 e B
6 – Tepraloxydim	71,25 c A	81,25 c B
7 – Haloxyfop-P-methyl	81,25 bc A	88,75 abc B
8 – Glyphosate	91,25 ab A	87,50 bc A
9 – Fenoxaprop-P-Ethyl	97,50 a A	98,75 a A
10 – Tembotrione	88,75 ab A	92,50 ab A
11 – Paraquat	71,25 c B	56,25 de A
12 – Saflufenacil	26,25 d B	3,75 g A
13 – MSMA	13,75 e A	26,25 f B
CV(%)	8,20	

*Médias de controle visual seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Resultados semelhantes em relação à suscetibilidade de biótipo resistente de buva (*Conyza bonariensis*) a herbicidas distintos ao glyphosate (paraquat, chlorimurom-ethyl, metsulfuron-methyl, 2,4-D e paraquat + diuron) foram obtidos por Vargas et al. (2007). Os autores chegaram à conclusão de que o biótipo resistente tinha igual suscetibilidade a herbicidas diferentes do glyphosate comparado com o biótipo suscetível, ou seja, o biótipo resistente não possuía resistência múltipla.

Tabela 5.6 – Massa fresca* aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos aplicados em condições de pós-emergência. Piracicaba, 2013-2014

Tratamento	Biótipo 34S	Biótipo 69R
1 – Testemunha	7,58 g B	5,07 gh A
2 – Glufosinate	3,72 fg B	1,64 fgh A
3 – Sethoxydim	4,83 de A	3,74 defg A
4 – Clethodim	1,33 ab A	2,14 abcd A
5 – Quizalofop-P-ethyl	3,94 cd B	2,54 bcde A
6 – Tepraloxydim	2,68 bc A	2,22 bcd A
7 – Haloxyfop-P-methyl	1,89 b A	0.78 ab B
8 – Glyphosate	1,46 ab A	1,95 abcd A
9 – Fenoxaprop-P-Ethyl	0,38 a A	0.35 a A
10 – Tembotrione	1,66 ab A	1,58 abc A
11 – Paraquat	2,43 b B	3,01 cdef A
12 – Saflufenacil	6,18 ef A	5,97 h A
13 – MSMA	6,27 fg B	4,13 efgh A
CV(%)	24,32	

*Médias de massa fresca seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A avaliação de massa fresca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, conforme era previsível, teve seus resultados semelhantes aos da avaliação de controle visual (Tabela 5.6). Os tratamentos que melhor controlaram o biótipo 34S, baseando-se na massa frasca aos 35 dias após a aplicação, foram os que continham os herbicidas clethodim, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione, resultados semelhantes aos obtidos na avaliação do controle visual, com exceção do clethodim, provavelmente devido à variação entre uma repetição e outra, aumentando o intervalo à variabilidade desse tratamento. Já o biótipo 69R teve como melhores tratamentos aqueles que continham os herbicidas clethodim, haloxifop-P-methyl, glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione, diferenciando da avaliação de controle visual, que não incluiu como eficientes os herbicidas clethodim e glyphosate. Dentre os 12 tratamentos contendo herbicida, quatro deles controlaram melhor estatisticamente o biótipo resistente, um controlou melhor o biótipo suscetível e sete tiveram eficácia estatisticamente igual.

Segundo o portal AGROFIT (BRASIL, 2014), apenas os herbicidas paraquat, glufosinate e glyphosate são recomendados para o controle de plantas daninhas na cultura do citros. Entretanto, como se pode observar pelos resultados, os demais herbicidas controlariam eficientemente tanto biótipos suscetíveis como resistentes, sendo uma opção ao produtor rural. Ainda, segundo Melo (2011), os herbicidas sethoxydim, chethodim, haloxyfop e tepraloxydim são altamente eficientes para o controle do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) e não causam injúrias às plantas de citros. Alguns desses herbicidas inibem a ação da enzima ACCase, da qual está envolvida na primeira reação da rota metabólica da produção de lipídios, da qual catalisa a transformação de Acetil-CoA em Malonil-CoA, os quais chegam a representar de 5 a 10% da massa vegetal. Essa enzima possui duas formas conhecidas, eucariota e procariota, sendo que a família Poaceae apresenta a forma eucariota nos cloroplastos e no citoplasma (forma de ACCase sensível aos herbicidas inibidores da ACCase), enquanto que as dicotiledôneas possuem a forma eucariota no citoplasma e a procariota (insensível aos herbicida inibidores da ACCase) no cloroplasto. A forma procariota presente nas dicotiledôneas é suficiente para produzir todo o Malonil-CoA que a célula necessita quando a forma eucariota é inibida por herbicidas, explicando assim a tolerância natural das dicotiledôneas aos herbicidas inibidores da ACCase (ALBAN; BALDET; DOUCE, 1994). Como avaliado por Melo et al. (2012), a ação de herbicidas inibidores da ACCase em associação com o glyphosate não causaram injúrias às plantas de citros, o que não explica a falta de produtos recomendados para essa cultura além de questões comerciais, ainda segundo o autor.

O controle de plantas daninhas em pós-emergência é, sem sombra de dúvidas, muito importante para garantir a produtividade colocada em cheque quando existe infestação tardia das plantas daninhas na lavoura. Por outro lado, as plantas daninhas possuem germinação heterogênea devido a variações naturais no banco de sementes. A germinação de sementes de plantas daninhas, quando em estádios iniciais do desenvolvimento da cultura, pode ser evitada através da aplicação de herbicidas pré-emergentes seletivos para a cultura de interesse, garantindo assim a ausência de plantas daninhas no período crítico de prevenção da interferência (PITELLI; DURIGAN, 1984). A cultura da soja, por exemplo, pode ter o período crítico de prevenção da interferência entre o 7º e o 53º dias, ou entre o 18º e 47º dias, dependendo do espaçamento, segundo estudo realizado por Melo et al. (2001), levando em conta a perda de produtividade aceitável de 2% (Nível de dano econômico). O feijão-comum,

semelhantemente à soja, pode ter redução de produtividade quando há convivência com plantas daninhas de apenas quatro dias, como estudado por Borchartt et al. (2011).

Os tratamentos pré-emergentes, de maneira geral, foram eficientes para controlar o capim-branco, até os 35 dias após a aplicação dos tratamentos. O biótipo 69R foi controlado por todos os herbicidas testados. Por outro lado, os herbicidas amicarbazone e chlorimuron-ethyl tiveram controle inferior do biótipo 34S, conforme é mostrado na Tabela 5.7. Vale também ressaltar que, dentre os produtos comerciais utilizados para o experimento de controle em pré-emergência, nenhum dos rótulos tinham recomendação para o controle da planta daninha capim-branco.

A integração entre herbicidas pré-emergentes e pós-emegentes pode resultar em controle mais efetivo das plantas daninhas do que apenas uma aplicação em pós ou apenas uma aplicação em pré-emergência. Jones et al. (2001) chegaram à conclusão de que a aplicação da atrazina em milho resistente a glufosinate na semeadura e glufosinate complementando o controle das plantas escapes em pós-emergência resultou em controle mais efetivo das plantas daninhas do que apenas a aplicação de glufosinate em pós-emergência. Johnson et al. (2000) também concluíram que a aplicação de um herbicida pré-emergente, complementado posteriormente com a aplicação de glyphosate em pós-emergência resultou em maior produtividade e menor presença de plantas daninhas, comparado com a aplicação apenas de glyphosate na pós-emergência. Thomas et al. (2004) concluiram que o controle de corda-de-viola era incrementado em mais de 27% quando era acrescentado um herbicida pré-emergente, em comparação com a aplicação apenas de glyphosate em pós-emergência.

Tabela 5.7 - Controle visual aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos aplicados em condições de pré-emergência. Piracicaba, 2013-2014

Tratamento*	Biótipo 34S	Biótipo 69R
1 – Testemunha	0.00 d A	0.00 b A
2 – Amicarbazone	88.75 b B	100.00 a A
3 – Chlorimurom-ethyl	65.00 c B	100.00 a A
4 – Clomazone	100.00 a A	100.00 a A
5 – Diclosulam	100.00 a A	100.00 a A
6 – Imazethapyr	100.00 a A	100.00 a A
7 – S-metholachlor	100.00 a A	100.00 a A
8 – Sulfentrazone	100.00 a A	100.00 a A
9 – Hexazinone	100.00 a A	100.00 a A
10 – Isoxaflutole	100.00 a A	100.00 a A
11 – Metribuzin	100.00 a A	100.00 a A
12 – Diuron + Hexazinone	100.00 a A	100.00 a A
13 - Tebuthiuron	100.00 a A	100.00 a A
CV(%)	8.30	

*Médias de controle visual seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O uso de mais de um mecanismo de ação no controle de uma planta daninha problema é recomendado tanto para evitar o aparecimento de biótipos resistentes como para remediar a seleção já ocorrida, de modo que essa diversificação de modos de ação resulta na redução do banco de sementes do solo (NORSWORTHY et al., 2012).

Em relação à massa fresca dos tratamentos em pré-emergência, o biótipo 69R foi controlado eficientemente por todos os tratamentos. Diferentemente da avaliação de controle visual, a avaliação de massa fresca apontou apenas controle inferior do biótipo 34S pelo herbicida chlorimuron-ethyl, conforme pode ser visto na Tabela 5.8.

Segundo Reddy e Norsworthy (2010) a rotação de culturas baseada em culturas geneticamente modificadas para a resistência ao glyphosate não é eficiente, uma vez que o sistema continua baseado na aplicação dessa molécula. Por outro lado, um estudo realizado por Neve et al. (2011), através de modelos matemáticos, mostrou que a rotação de culturas

resistentes ao glyphosate com culturas resistentes a glufosinate ou cultivares convencionais reduz o número de aplicações de glyphosate durante o ano. Nesse estudo, as chances de surgimento de biótipos resistentes de Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) se reduziram em 50%, quando comparado com a utilização apenas de culturas resistentes ao glyphosate.

Tabela 5.8 – Massa fresca* aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos em pós-emergência. Piracicaba, 2013-2014

Tratamento	**Biótipo 34S**	**Biótipo 69R**
1 – Testemunha	1.42 b B	0.92 b A
2 – Amicarbazone	0.70 a A	0.70 a A
3 – Chlorimurom-ethyl	0.72 a A	0.70 a A
4 – Clomazone	0.70 a A	0.70 a A
5 – Diclosulam	0.70 a A	0.70 a A
6 – Imazethapyr	0.70 a A	0.70 a A
7 – S-metholachlor	0.70 a A	0.70 a A
8 – Sulfentrazone	0.70 a A	0.70 a A
9 – Hexazinone	0.70 a A	0.70 a A
10 – Isoxaflutole	0.70 a A	0.70 a A
11 – Metribuzin	0.70 a A	0.70 a A
12 – Diuron + Hexazinone	0.70 a A	0.70 a A
13 - Tebuthiuron	0.70 a A	0.70 a A
CV(%)	7.04	

*Médias de massa fresca seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Obara (2014) estudou o efeito da associação entre imazapic e imazapyr no controle de plantas daninhas em área de cana-de-açúcar e concluiu que a planta daninha *Chloris polydactyla* foi eficientemente controlada em pré-emergência pela associação dessas moléculas, com controle residual de até 120 dias após a aplicação. Nesta área não há histórico de falhas de controle do capim-branco pelo herbicida glyphosate, o que sugere que o biótipo estudado pelo autor seja suscetível.

Lopes-Ovejero et al. (2013) estudaram o uso de herbicidas pré-emergentes (sulfentrazone, flumioxazin, imazethapyr, diclosulam, chlorimuron e s-metolachlor) em cultivar de soja resistente ao glyphosate, avaliando os tratamentos pré-emergentes aos 28 dias após a aplicação, assim como estudaram pré-emergentes complementados por aplicação de glyphosate sobre as plantas daninhas *Amaranthus viridis*, *Brachiaria plantaginea*, *Bidens pilosa*, *Commelina benghalensis*, *Eleusine indica*, *Euphorbia heterophylla* e *Raphanus raphanistrum*. Cada herbicida teve sua peculiaridade como, por exemplo, o sulfentrazone, que não controlou eficientemente *Raphanus raphanistrum* e *Brachiaria plantaginea*, porém controlou eficazmente *Commelina benghalensis* e *Euphorbia heterophylla*. Por outro lado, o herbicida diclosulam controlou eficientemente todas as plantas daninhas avaliadas, com excessão de *Brachiaria plantaginea*. A mensuração da produtividade apontou que não houve diferenças estatísticas de produtividade quando utilizado herbicida pré-emergente na soja resistente ao glyphosate.

5.4 Conclusões

Os herbicidas que melhor controlaram o biótipo 34S foram glyphosate, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione.

Os herbicidas que melhor controlaram o biótipo 69R foram haloxyfop-P-methyl, fenoxaprop-P-ethyl e tembotrione.

Os tratamentos pré-emergentes, de maneira geral, foram eficientes para controlar o capim-branco, até os 35 dias após a aplicação dos tratamentos. O biótipo 69R foi controlado por todos os herbicidas testados. Apenas os herbicidas amicarbazone e chlorimuron-ethyl tiveram controle inferior do biótipo 34S.

Em relação à massa fresca dos tratamentos em pré-emergência, o biótipo 69R foi controlado eficientemente por todos os tratamentos.

Não foi possível estabelecer uma relação entre diferenças de suscetibilidade entre os biótipos, ou seja, a resistência do biótipo 69R ao glyphosate não alterou sua suscetibilidade aos herbicidas alternativos ao glyphosate estudados.

Referências

ADEGAS, F.S.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E. Soja transgênica resistente ao glyphosate como ferramenta para o manejo de plantas daninhas e produção sustentável. In: VELINI, E.D.; CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; TRINDADE, M.L.B. (Ed.). **Glyphosate**: uso sustentável. Botucatu: FEPAF, 2012. p. 203-213.

ALBAN, C.; BALDET, P.; DOUCE, R. Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. **Biochemical Journal**, London, v. 300, p. 557-565, 1994.

ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v. 1, n. 1, p. 35-38, 1974.

BORCHARTT, L.; JAKELAITIS, A.; VALADÃO, F.C.A.; VENTUROSO, L.A.C.; SANTOS, C.L. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, p. 725-734, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Acesso em: 02 maio 2014.

CARVALHO, L.B.; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.L.C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRATO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, n. 2, p. 171-176, 2011.

CÉLERES CONSULTORIA. **Informativo botecnologia**. Disponível em: <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>.Acesso em: 20 abr. 2014.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; TRENTIN, R.; TOCCHETTO, S.; MAROCHI, A.I.; GALLI, A.J.B.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M. Herbicidas alternativos no manejo da planta daninha azevém (*Lolium multiflorum*) resistente ao herbicida glyphosate, aplicados em diferentes estádios fenológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., São Pedro, 2004. **Resumos...** São Pedro: SBCPD, 2004. p. 267.

FRISVOLD, G.B.; HURLEY, T.M; MITCHEL, P.D. Adoption of best management practices to control weed resistance by corn, cotton, and soybean growers. **Agbioforum**, Columbus, v. 12, p. 370–381, 2009.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 20 set. 2013.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale – general for descriptions pf the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, p. 433-441, 1997.

HURTLEY, T.M.; MITCHELL, P.D.; FRISVOLD, G.B. Weed management costs, weed best management practices, and the Roundup Ready weed management program. **Agbioforum**, Columbia, v. 12, p. 281–290, 2009.

INOUE, M.H. OLIVEIRA JR., R.S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.I. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 193-214.

JOHNSON, G.; BREITENBACH, F.; BEHNKEN, L.; MILLER, R.; HOVERSTAD, T.; GUNSOLUS, J. Comparison of herbicide tactics to minimize species shift and selection pressure in glyphosate-resistant soybean. **Weed Technology**, Lawrence, v. 26, p. 189-194, 2012.

JOHNSON, W.G.; BRADLEY, P.R.; HART, S.E.; BUESINGER, M.L.; MASSEY, R.E. Efficacy and economics of weed management in glyphosate-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 14, p. 57–65, 2000.

JONES, C.A.; CHANDLER, J.M.; MORRISON JR, J.E.; SENSEMAN, S.A.; TINGLE, C.H. Glufosinate combinations and row spacing for weed control in glufosinate-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 15, p. 141–147, 2001.

LAMEGO, F.P. VIDAL, R.A. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, p. 467–471, 2008.

LAMEGO, F.P.; KASPARY, T.E.; RUCHEL, Q.; GALLON, M.; BASSO, C.J.; SANTI, A.L. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, p. 433-442, 2013.

LLEWELLYN, R.S. Information quality and effectiveness for more rapid adoption decisions by producers. **Field Crops Research**, Bonn, v. 104, p. 148–156, 2007.

LEGLEITER, T.R.; BRADLEY, K.W.; MASSEY, R.E. Glyphosate-resistant waterhemp (*Amaranthus rudis*) control and economic returns with herbicide programs in soybean. **Weed Technology**, Lawrence, v. 23, p. 54–61, 2009.

LOPES OVEJERO, R.F.; SOARES, D.J.; OLIVEIRA, W.S.; FONSECA, L.B.; BERGER, G.U.; SOTERES, J.K.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Residual herbicides in weed management for glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, p. 947-956, 2013.

MATHEIS, H.A.S.M.; AZEVEDO, F.A.; VICTORIA FILHO, R. Adubação verde no manejo de plantas daninhas na cultura de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, n. 1, p. 101-110, 2006.

MELO, H.B.; FERREIRA, L.R.; SILVA, A.A.; MIRANDA, G.V.; ROCHA, V.S.; SILVA, C.M.M. interferência das plantas daninhas na cultura da soja cultivada em dois espaçamentos entre linhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, p. 187-191, 2001.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate.** 2011. 73 p.

Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MELO, M.S.C.; ROSA, L.E.; BRUNHARO, C.A.C.G.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas de controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v. 11, p. 195-203, 2012.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadenses* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

MUELLER, T.C.; MITCHELL, P.D.; YOUNG, B.G.; CULPEPPER, A.S. Proactive versus reactive management of glyphosate-resistant or tolerant weeds. **Weed Technology**, Lawrence, v. 19, p. 924–933, 2005.

NEVE, P.; NORSWORTHY, J.K.; SMITH, K.L.; ZELAYA, I.A. Modelling glyphosate resistance management strategies for Palmer amaranth in cotton. **Weed Technology**, Lawrence, v. 25, p. 335–343, 2011.

NORSWORTHY, J.K.; WARD, S.M.; SHAW, D.R.; LLEWELLYN, R.S.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; BRADLEY, K.W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S.B.; BURGOS, N.R.; WITT, W.W.; BARRET, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, Lawrence, v. 60, p. 31-62, 2012.

OBARA, F.E.B. **Atributos do solo, presença de palha e estádio de desenvolvimento da cana-de-açúcar na aplicação, afetando a eficácia e seletividade dos herbicidas imazapic e imazapyr**. 2014. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

PINOTTI, E.B.; SALES, T.C.; MINATEL, L.F.C.; BARBOSA, R.Z. Levantamento florístico de plantas daninhas na cultura da laranja (*Citrus sinensis*). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 7, n. 15, p. 1-6, jun. 2009.

PITELLI, R.A. As plantas daninhas e o manejo de pomares de citros. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, n. 43, p. 6-8, 2004.

PITELLI, R.A.; DURIGAN, J.C. Terminologia para períodos de controle e convivência das plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 15., 1984, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: SBCPD, 1984. p. 37.

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

REDDY, K.N.; NORSWORTHY, J.K. Glyphosate-resistant crop production systems: impact on weed species shifts. In: NANDULA, V.K. (Ed.). **Glyphosate resistance in crops and weeds**: history, development, and management. Singapore: Wiley, 2010. p. 165–184.

RIBEIRO, D.N. **Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha *Lolium multiflorum* (Lam.).** 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em

Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistance of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) to glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, p. 301–306, 2004.

SANTOS, G.; OLIVEIRA Jr.; R.S.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, M.F.P.S. Buva com resistência múltipla a herbicidas é identificada como *Conyza sumatrensis* no Paraná. **Informe técnico PGA-UEM**, Maringá, v. 1, n. 1, p. 1-3, mar. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina, 1995. 42 p.

THOMAS, W.E.; BURKE, I.C.; WILCUT, J.W. Weed management in glyphosate-resistant corn with glyphosate, halosulfuron, and mesotrione. **Weed Technology**, Lawrence, v. 18, p. 826–834, 2004.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotypes in apple orchards. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, p. 617–622, 2004.

VARGAS, L.; BIANCHI, M.A.; RIZZARDI, M.A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T. *Conyza bonariensis* biotypes resistant to the glyphosate in Southern Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, p. 573–578, 2007.

WILSON, R.S.; TUCKER, M.A.; HOOKER, N.H.; LEJEUNE, J.T.; DOOHAN, D. Perceptions and beliefs about weed management: perspectives of Ohio grain and produce farmers. **Weed Technology**, Lawrence, v. 22, p. 339–350, 2008.

6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA PLANTA DANINHA *Chloris polydactyla* AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

O objetivo da pesquisa foi estudar os mecanismos que conferem resistência do biótipo 69R em sobreviver ao controle pelo glyphosate. Para isso, foi comparada a absorção foliar do ^{14}C-glyphosate nos biótipos 34S e 69R com deferentes adições de adjuvantes, sendo também estudada a absorção e translocação do ^{14}C-glyphosate em função do tempo após sua aplicação. Além disso, também foi estudado o acúmulo do ácido chiquímico após a aplicação de glyphosate e a possibilidade do mecanismo de resistência ser resultante de mutação no gene que codifica a EPSPs. O biótipo 69R absorveu menor quantidade de ^{14}C-glyphosate em relação ao biótipo 34S em todos os tratamentos, do qual foi estatisticamente inferior àqueles contendo ^{14}C-glyphosate + surfactante não-iônico (0,25%), ^{14}C-glyphosate + sulfato de amônio (3kg ha^{-1}) e ^{14}C-glyphosate isolado. O tratamento que proporcionou maior absorção para ambos os biótipos foi o ^{14}C-glyphosate + surfactante não-iônico. O biótipo 69R teve absorção máxima 17% inferior ao biótipo 34S e 27% maior retenção na folha tratada às 12 HAT e 24% maior retenção foliar 48 HAT. O acúmulo de ácido chiquímico no biótipo 34S foi 2,56 vezes maior que no biótipo 69R. Nenhuma mutação no gene que codifica a EPSPs foi observada. Conclui-se que a absorção foliar reduzida e a maior retenção do ^{14}C-glyphosate nas folhas do biótipo 69R, contribuem de forma significativa para o mecanismo de resistência desse biótipo ao glyphosate.

Palavras-chave: Absorção e translocação; Ácido chiquímico; Mutação; Mecanismo de resistência

Abstract

The objective of the research was to study the mechanisms that confers resistance of the biotype 69R survival to the control by glyphosate. It was compared the ^{14}C-glyphosate foliar absorption by biotypes 34S and 69R with additions of various adjuvants,, being also studied uptake and translocation of ^{14}C-glyphosate over time. In addition, shikimic acid accumulation was studied after glyphosate application, and the possibility of the mechanism of resistance as result of mutation in the gene encoding EPSPs. The biotype 69R absorbed smaller amount of ^{14}glyphosate relative to 34S biotype in all treatments, which was statistically inferior to those containing ^{14}C-glyphosate + non-ionic surfactant (0.25%), ^{14}glyphosate + ammonium sulfate (3 kg ha^{-1}) and ^{14}glyphosate alone. The treatment providing greater absorption for both biotypes was ^{14}C-glyphosate + non-ionic surfactant. The biotype 69R had maximum absorption of 17% less than the biotype 34S, 27% higher leaf retention at 12HAT and 24% higher leaf retention at 48 HAT. The accumulation of shikimic acid in the biotype 34S was 2.56 times higher than in biotype 69R. No mutations in the gene encoding EPSPs was observed. The reduced absorption and retention of ^{14}C-glyphosate in the treated leaf of biotype 69R, have an important role in the resistance of this biotype to glyphosate.

Keywords: Absorption and translocation; Shikimic acid; Mutation; Mechanism of resistance

6.1 Introdução

Dentre as características do herbicida glyphosate que intensifica seu uso na agricultura está a capacidade de translocar das diversas partes do tecido vegetal para os meristemas, raízes e órgãos de propagação vegetativa, inibindo a ação da EPSPs, enzima essencial na biossíntese de aminoácidos aromáticos e diversos outros compostos secundários (AMRHEIN et al., 1980). Os genes que expressam a EPSPs são mais ativos nos meristemas, seguidos por colmos, folhas maturas e cotilédones (WEAVER; HERMANN, 1997). Trabalho realizado por Feng et al. (2003) evidenciou que existe íntima relação entre a expressão da EPSPs no tecido vegetal e a suscetibilidade ao glyphosate.

Os mecanismos que conferem a resistência de plantas daninhas ao glyphosate podem ser divididos em duas classes: (a) relacionados ao sítio de ação (chamada de específica) e (b) não relacionados ao sítio de ação (chamada de não específica). No primeiro caso, o herbicida atinge o sítio de ação, mas não consegue inibir a enzima do biótipo resistente, como acontece com os biótipos resistentes ao glyphosate que possuem mutação na posição 106 da EPSPs, onde pode haver uma substituição do aminoácido prolina por uma serina, threonina, alanina ou leucina, mudando a forma com que o glyphosate se “acopla” à EPSPs (PEREZ-JONES et al., 2007; YU, CAIRNS; POWLES, 2007; PRESTON et al., 2009; WAKELIN; PRESTON, 2006; KAUNDUN et al., 2008; FUNKE et al., 2009). Há também casos em que o herbicida é capaz de realizar sua função, ou seja, inibir a ação da EPSPs, mas os biótipos resistentes possuem a habilidade de produzir mais EPSPs do que o glyphosate é capaz de inibir, conhecida como superexpressão gênica (GAINES et al., 2010). Quanto à resistência não relacionada ao sítio de ação, existem diversos mecanismos que conferem ao biótipo resistente a habilidade de sobreviver após uma aplicação de glyphosate: baixa absorção, baixa translocação, compartimentalização do herbicida no vacúolo e metabolismo do herbicida (DÉLYE, 2011; YUAN; TRANEL; STEWART JR., 2006).

Por outro lado, esses mecanismos não estão relacionados apenas à resistência de biótipos ao glyphosate, também podendo ser extrapolados para outros herbicidas. Biótipos de *Lolium rigidum* foram diagnosticados como resistentes a herbicidas inibidores do fotossistema II, inibidores da ACCase e inibidores da ALS através da metabolização das moléculas de herbicida, do qual representa um mecanismo de resistência não relacionado ao sítio de ação (PRESTON et al., 1996). Também por elevado metabolismo, biótipos de *Alopercurus myosuroides* são resistentes devido à atividade do complexo enzimático P450 (MOSS;

CUSSANS, 1985). Da mesma maneira, biótipos *Echinochloa phyllopogon* foram constatados como resistentes ao fenoxaprop-p-mehtyl devido ao seu metabolismo pela glutathiona S-transferase (BAKKALI et al., 2007).

Entretanto, um dos casos mais curiosos é a resistência de diversos biótipos ao herbicida paraquat (PRESTON et al., 2005; SOAR et al., 2003; VÁRADI; DARKÓ; LEHOCZKI, 2000; YU; CAIRNS; POWLES, 2004), pois sabe-se que a sobrevivência de certos biótipos após a aplicação do paraquat é devido à baixa translocação do herbicida na planta, mas não se sabe qual é o mecanismo que confere essa resistência, nem para onde vai o herbicida, mas acredita-se que o paraquat seja capturado pela parede celular ou levado por transporte ativo através de algum carregador para o vacúolo (LASAT et al., 1997). Sabe-se também que a translocação diferenciada do paraquat nos biótipos resistentes é dependente da temperatura, onde o mecanismo de resistência funciona apenas em temperaturas moderadas (LASAT et al., 1996).

Quanto aos mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação, dá-se destaque aos herbicidas inibidores da ALS, ACCase e fotossistema II. Os herbicidas do grupo triazinas, por exemplo, vem sendo usados desde meados dos anos 50, e até hoje foram identificadas 72 espécies que possuem biótipos resistentes a estes herbicidas (HEAP, 2014). Diversos desses biótipos resistentes às triazinas possuem uma substituição de uma serina por uma glicina na posição 264 do gene que codifica a proteína D1, importante molécula do fotossistema II (ARNTZEN; PFISTER; STEINBACK, 1982). Da mesma forma, a principal forma de resistência aos herbicidas inibidores da ALS é a mutação no gene que codifica essa enzima, onde já são conhecidas mais de 22 mutações em sete posições diferentes neste gene (TRANEL; WRIGHT, 2002). Já no caso da resistência aos inibidores da ACCase, a principal forma de resistência é por mutação no gene que codifica a carboxil transferase (ZAGNITKO et al., 2001; DÉLYE; WANG; DARMENCY, 2002).

Dentre as práticas agronômicas que influenciam no aparecimento de biótipos resistentes estão à dependência de apenas um herbicida durante o ciclo de produção e em vários ciclos consecutivos, ausência de controle alternativos ao controle químico, adoção dos chamados “pousios”, falta de conhecimento do banco de sementes e do conhecimento de como manejá-lo em prol do agricultor, dosagens diferentes daquelas recomendadas no rótulo de produto e produtos com efeito residual muito prolongado. Para o manejo racional dos biótipos resistentes de plantas daninhas é necessário o conhecimento dos mecanismos de

resistência, sendo que no caso do capim-branco (*Chloris polydactila*) não existem trabalhos relatados na literatura. Sendo assim, foi de desenvolvida a presente pesquisa com o objetivo de estudar os mecanismos que conferem resistência do biótipo 69R em sobreviver ao controle pelo glyphosate.

6.2 Material e Métodos

Os experimentos realizados nesta etapa do trabalho foram realizados tanto no Weed Research Laboratory quanto no Weed Molecular Laboratory. Ambos os laboratórios estão localizados na Colorado State University, Fort Collins, CO, Estados Unidos da América do Norte. Para que a pesquisa fosse possível de ser realizada, as sementes dos biótipos foram exportadas do Brasil aos Estados Unidos da América através do departamento de agricultura daquele país (USDA) e por meio de sua agência especializada na fiscalização de plantas e animais que regula a entrada e saída de material biológico (APHIS – Animal and Plant Health Inspection Service), como pode ser consultado nos anexos deste texto (ANEXO).

6.2.1 Absorção do herbicida glyphosate nos biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*

O experimento foi conduzido durante os meses de abril a maio de 2014. Os biótipos do capim-branco foram semeados em bandejas em substrato comercial (55% Canadian Sphagnum peat moss, vermilucita e agentes humidificantes) e imediatamente colocados em câmara de crescimento (TOLIN MECHANICAL, EUA), com umidade relativa de 80%, temperatura média de 27º C, duração do dia de 14 horas, intensidade de luz. Quando os *seedlings* se estabeleceram, estes foram transferidos para vasos individuais e mantidos em câmara de crescimento até atingirem o estádio 23 na escala da BBCH (HESS et al., 1997), momento em que os tratamentos com glyphosate marcado (^{14}C-glyphosate) apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Lista de tratamentos aplicados nos biótipos 34S e 69R para avaliação da absorção com diferentes adjuvantes. Fort Collins, 2014

Tratamento	Dose*	Adjuvante
1 – ^{14}C-Glyphosate	700	Sulfato de amônio (0,75)**
2 – ^{14}C-Glyphosate	700	Sulfato de amônio (1,5)
3 – ^{14}C-Glyphosate	700	Sulfato de amônio (3,00)
4 – ^{14}C-Glyphosate	700	Óleo emulsificante (Cornbelt®, 1%)
5 – ^{14}C-Glyphosate	700	Surfactante não-iônico (Galactitc®, 0,25%)
6 – ^{14}C-Glyphosate	700	-

*Dose em gramas de equivalente ácido por hectare. **kg por hectare

Primeiramente, a partir de uma "solução estoque" de glyphosate marcado, foram transferidos para um tubo *eppendorf*, 400 uL dessa solução concentrada, para que cada planta recebesse o total de 40.000 desintegrações por minuto (DPM). Em seguida, essa solução foi totalmente evaporada para que no tubo restasse somente ^{14}C-glyphosate puro, e em seguida foram adicionados novamente uma solução de cada tratamento, juntamente com glyphosate não-marcado na dosagem informada na Tabela 6.1. Os tratamentos foram realizados na folha mais nova que estava totalmente expandida. A aplicação foi realizada com a ajuda de uma pipeta de precisão (GILSON PIPETMAN®), da qual foram aplicadas cinco gotas de 1 uL cada. As plantas foram deixadas por aproximadamente uma hora para que todos os tratamentos aplicados secassem/tornassem estáveis para o transporte das plantas novamente para a câmara de crescimentos, onde permaneceram até o momento da coleta das amostras.

Passadas 48 horas da aplicação dos tratamentos, cada planta teve sua folha aplicada amostrada com uma tesoura, rente à lígula e imediatamente lavada em 10 ml, dentro de frascos por agitação com a utilização de um *vortex*, de uma solução contendo 10% metanol, 89,75% água deionizada e 0,25% surfactante não-iônico (NIS), para que o ingrediente ativo remanescente na superfície foliar fosse retirado e calculado posteriormente. Os 10 ml em que as folhas foram lavadas tiveram adição de outros 10 ml de um coquetel de cintilação líquida para a leitura da radiação beta emitida pelos átomos marcados na molécula do glyphosate, chamado Ultima Gold™, do qual dispensa a correção da fluorescência de Quench (GIBSON, 1980). Também foram feitas amostras designadas *blank*, ou seja, sem a adição de qualquer outro produto além do coquetel, e foi também realizada a adição de ^{14}C-glyphosate

diretamente no coquetel para que a quantidade de glyphosate aplicado em cada planta fosse mensurada com maior precisão. Por fim, os frascos foram colocados em um analisador de cintilação líquida e os resultados obtidos foram submetidos à seguinte formula (equação 6.1) para a obtenção da quantidade de glyphosate absorvido:

$$\%\ de\ Absorção = 100 - (\frac{DPM\ retirada\ da\ folha\ aplicada}{DPM\ total\ aplicada}) * 100 \qquad (6.1)$$

Com a obtenção dos dados de absorção, estes tiveram os dados de homogeneidade da variância analisada, bem como a análise dos seus resíduos e em seguida foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey, em um esquema fatorial, com dois fatores, onde o fator biótipo teve dois níveis (biótipo 34S e 69R) e o fator tratamento teve seis níveis (tratamentos de 1 a 6, conforme Tabela 6.1), a 5% de probabilidade.

6.2.2 Absorção e translocação do herbicida glyphosate em função do tempo em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*

O ^{14}C-glyphosate (ARC, ^{14}C-glyphosate-phosphomethyl, EUA) armazenado em uma solução estoque foi retirado para a aplicação dos experimentos na quantidade de 0,5 ml e misturado com o glyphosate em formulação comercial Roundup WeatherMax (700 g e.a.ha^{-1}), onde cada planta receberia um total de 180.000 dpm, divididos em três gotas de 1 ul cada, com a ajuda de um microaplicador. As sementes foram colocadas para germinar em substrato comercial (descrito no item 4.2.1) até se tornarem *seedlings*, momento em que foram transplantados para areia, que preencheu tubos do tipo Falcon, com capacidade para 50ml. Anteriormente à transferência da areia ao tubo Falcon, esta foi seca por dois dias para atingir massa constante e cada tubo Falcon recebeu 70 g de areia. Para a manutenção das plantas, foi utilizada solução completa de Hoagland, diluída quatro vezes para evitar a salinização das plantas. Foram aplicadas cinco repetições em cada biótipo, sendo que uma repetição foi destinada a autorradiografias e as outras quatro seriam analisadas estatisticamente. As aplicações foram realizadas na folha totalmente expandida mais nova, procurando-se instalar as três gotas sempre no terço médio do limbo foliar em todas. As avaliações constaram de coletas destrutivas às 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a aplicação dos tratamentos, onde as

plantas foram separadas nas seguintes partes: solução lavada da folha aplicada (para quantificação da absorção pelo tempo), folha tratada, colmos, raízes e exsudação.

A "solução lavada", para avaliação da absorção, foi realizada com uma solução contendo 10% metanol, 89,75% de água deionizada e 0,25% de um surfactante não-iônico, na quantidade de 10 ml. Os limbos foliares foram retirados do restante da planta com a ajuda de uma tesoura e colocados em frascos do tipo *scintilation vials*, com capacidade para 20 ml, preenchidos com a solução anteriormente citada, e agitados com a ajuda de um *Vortex*. Após a agitação do conjunto solução + folha tratada, a folha tratada foi retirada do frasco e colocada para secar em papel filtro. A solução lavada teve a adição do coquetel Ultima Gold™, e colocado para leitura em um analisador de cintilação líquida (PACKARD 2500 TR, EUA). As folhas, colmos e raízes foram separados e colocados para secar em estufa de circulação forçada por 72 horas à 60º C e em seguida foram carbonizados em um oxidador (Biological Oxidizer OX 500, EUA, 90% de eficiência), da qual transforma a amostra inserida em $^{14}CO_2$ e o transfere para um frasco com 20 ml de coquetel (R. J. Harvey Instruments, C-14 cocktail™, UN2924, EUA), que em seguida também foram analisados em um analisador de cintilação líquida. A areia que continha as plantas também foi seca e em seguida lavada cuidadosamente com 10 pipetagens de 10 ml cada, totalizando uma solução 100 ml + 70g de areia, da qual foram coletados 10 ml para a contabilização da exsudação de ^{14}C-glyphosate pelas raízes.

As plantas que não foram utilizadas para a oxidação e quantificação de ^{14}C-glyphosate em suas partes foram submetidas à autorradiografia. Um indivíduo de cada biótipo por coleta foi prensado por uma semana como se fosse uma exsicata, e em seguida foram transferido para um *cassette* (GE Health Care, EUA) e alí permaneceu por 48 horas para que as partículas betas emitidas pelo glyphosate marcado fossem captadas. Após esse período, os cassettes foram lidos em um *Phosphorus Imaging* (Molecular Dynamics, Storm 860, EUA) (imagens não apresentadas).

As análises estatísticas foram realizadas através do software Sisvar (FERREIRA, 2011), onde foi utilizado o teste t para comparar pontualmente a renteção foliar, presenção da ^{14}C-glyphosate nos colmos, raízes e exsudados radiculares, a 5% de probabilidade, e os gráficos foram gerados pelo software SigmaPlot 12.0 (SYSTAT SOFTWARE, San Jose, CA). A análise da absorção pelo tempo foi realizada com o software SigmaPlot 12.0, em que os parâmetros das equações escolhidas foram utilizados para comparar os biótipos.

6.2.3 Acúmulo de ácido chiquímico em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla* ao glyphosate

As sementes dos biótipos foram colocadas para germinar em bandejas com substrato comercial devidamente adubado e mantidas em casa-de-vegetação ao longo do experimento. Logo após a emergência das plântulas, estas foram realocadas em pequenos vasos, na quantidade de uma planta por vaso. Para o tratamento herbicida foi utilizada uma câmara de aplicação, trabalhando a uma pressão constante de 2,0 bar e pressurizada com CO_2, equipado com um bico do tipo leque XR 110.02, com um volume de calda correspondente a 200 L ha^{-1}. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, em esquema fatorial, com cinco repetições, 10 tratamentos e dois biótipos.

Quando as plantas atingiram o estádio 23 (BBCH), foram aplicadas os seguintes tratamentos (Tabela 6.2):

Tabela 6.2 - Tratamentos aplicados para a realização do ensaio com acúmulo de chiquimato

Tratamento	Produto Comercial
1- Glyphosate 0 g e. a. ha^{-1}	-
2- Glyphosate 90 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
3- Glyphosate 180 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
4- Glyphosate 360 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
5-Glyphosate 540 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
6- Glyphosate 720 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
7- Glyphosate 900 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
8- Glyphosate 1080 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
9- Glyphosate 1440 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max
10-Glyphosate 1800 g e. a. ha^{-1}	Roundup Weather Max

Após 48 horas da aplicação, foi retirado um disco foliar de 4 mm de diâmetro do tecido foliar mais novo por repetição e colocados em *microplate* com capacidade para 96 discos foliares, conforme metodologia desenvolvida por Shaner et al. (2005). Segundo Lydon

e Duke (1988), estudando plantas de soja e de caruru (*Amaranthus retroflexus*) concluíram que os tecidos mais novos dessas espécies acumulavam de quatro a oito vezes mais ácido chiquímico do que em tecidos mais velhos. Da mesma maneira, Arnaud et al. (1994) perceberam que plantas da trigo tinham a maior atividade da EPSPs nos meristemas, comparado com o restante da planta. Cada disco foliar foi imerso em solução de 100 microlitros de fosfato de amônio e, em seguida, o *microplate* foi revestido com papel filme para evitar a evaporação das soluções e dos tecidos vegetais e incubados por 23 horas a 26º C embaixo de uma luz florescente e em cima de um papel alumínio para que a luz fluorescente atue tanto na parte superior quanto na inferior dos discos foliares. Após a incubação, o *microplate* foi incubado em freezer -20º C até que a solução em que os discos foliares estavam submersos congelasse e logo em seguida foi colocado para descongelar a temperatura ambiente por 30 minutos. Após os 30 minutos, 25 microlitros de 1,25 N HCl foram adicionados à solução com os discos foliares, com concentração final de 0,25 N HCl em cada repetição.

Em seguida, o *microplate* foi transferido para uma estufa à 60º C por 15 minutos, da qual este tempo é variável, dependendo da coloração dos tecidos vegetais, onde a intenção é que eles atinjam a coloração acizentada, que indica completa penetração do ácido clorídrico no tecido vegetal. Em seguida, a concentração de ácido chiquímico foi determinada em um espectrofotômetro. Alíquotas de 25 microlitros da solução nos *microplates* contendos os discos foliares eram transferidas para um novo *microplate*, juntamente com 100 microlitros de 0,25% ácido periódico/0.25% meta-periodate em cada espaço. Este novo *microplate* contendo as soluções descritas foi incubado a temperatura ambiente por 90 minutos e então 100 microlitros de uma solução contendo 0,6 N hidróxido de sódio/0,22 M de sulfato de sódio foram adicionados a cada repetição. Por fim, após trinta minutos de incubação a temperatura ambiente, este novo *microplate* foi submetido à leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 380 nm. Para a mensuração dos dados obtidos por espectrofotômetro, foi também utilizada uma curva padrão de ácido chiquímico, com concentrações conhecidas, para que os resultados da espectrofotometria dos tratamentos pudessem ser comparados com a curva padrão.

A análise estatística inicial foi realizada através do software SAS, onde foi analisada a normalidade dos resíduos e homogeneidade da variância a 5% de probabilidade. Em seguida, foi utilizado o pacote “drc” do software estatístico R (RITZ; STREIBIG, 2005) para as análises das regressões não-lineares do tipo log-logística. A partir deste, os dados de acumulo

de ácido chiquímico foram ajustados ao modelo log-logístico citado por Knezevic et al. (2007), que possui a seguinte equação de regressão não-linear:

$$Y = \frac{d}{1 + \exp[b(\log x - loge)]} \qquad (6.2)$$

Onde “Y” é a variável avaliada; “x” é a dose do herbicida; “b” é a declividade da curva ao entorno de “e”, “d” é o limite superior da curva e “e” corresponde à dose que proporciona 50% de resposta da variável. Neste caso, o limite inferior é zero, levando a regressão a três parâmetros. Foi também calculado o fator de resistência entre os biótipos 34S e 69R a partir dos dados obtidos de duas I_{50}, I_{80} e I_{95}, neste caso, é a quantidade de glyphosate necessária para aumentar o acúmulo de ácido chiquímico em 50% em relação à testemunha.

6.2.4 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla* ao glyphosate

As amostras dos biótipos 34 e 69 foram coletadas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, da qual foi escolhido o tecido vegetal mais jovem, na quantidade de quatro repetições por biótipo. Este tecido vegetal foi estocado em um tubo eppendorf® com volume de 1,5 ml e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido (por volta de -210°C) até o fim da coleta, dos quais em seguida foram armazenados em um freezer à temperatura de -80ºC para posterior extração do material genético. A necessidade de se mergulhar o tecido vegetal imediatamente após sua coleta, é para evitar que os componentes moleculares sejam degradados (JONES et al., 2012).

As amostras congeladas foram maceradas com a ajuda de um almofariz e nitrogênio líquido, sempre mantendo as amostras resfriadas, para evitar a ação das nucleases e destruição das moléculas de ácido nucleico. Ao final da maceração, foi usado o kit RNeasy® Plant Mini Kit, para a extração do RNA mensageiro das amostras (mRNA), conforme orientação do fabricante. Anteriormente à adoção do procedimento de extração de RNA, foram feitas várias tentativas de análise do gene que codifica a EPSPs através de DNA genômico. Entretanto, quando esse procedimento é adotado em plantas que não possuem seu código genético

totalmente conhecido na literatura, existe a possibilidade de entre partes do gene que realmente que codifica a proteína – exons – estarem presentes partes que não codificam a proteína – introns -, por isso a necessidade da sintetização do DNA complementar (ALBERTS et al., 2002). Após a extração do mRNA, foi utilizado um espectrofotômetro (NanoDrop® 2000c) para a quantificação da concentração desse ácido nucleico e sua pureza.

Após a extração do RNA com a ajuda do kit acima citado, foi necessária a utilização de outro kit, o DNase I, Amplification Grade®, para a digestão de DNA com uma e duas fitas para formas menores, ou seja, eliminação do DNA presente nas amostras, para que nelas contenham apenas RNAm, segundo especificações do fabricante.

Obtendo-se nas amostras apenas RNA de fita simples, foi utilizado o último kit qScript™ cDNA SuperMix para a obtenção de DNA complementar (cDNA), que é o código genético que irá codificar a proteína desejada sem a presença dos introns, conforme orientação do fabricante. Esse kit contém os componentes necessários para a transformação de mRNA a cDNA por conter em sua composição reagentes como solução tampão, cloreto de magnésio, primers, nucleotídeos e a proteína transcriptase reversa.

Com o cDNA sintetizado, procedeu-se com a confecção de primers específicos para amplificar apenas a sequencia de ácidos nucleicos referentes ao gene que codifica a EPSPs. Para isso, foram consultadas diversas literaturas (KAUNDUN et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; GAINES et al., 2010; PEREZ-JONES et al., 2007) e bibliotecas online (NCBI – National Center for Biotechnology Information) para obter-se a sequencia de nucleotídeos e aminoácidos que codificam a EPSPs em espécies evolutivamente próximas ao capim-branco, como o *Lolium multiflorum* e a *Digitaria insularis*. Através de diversas tentativas e erros, o primer que melhor amplificou a sequencia desejada foi o seguinte: 5'-TAGTACAGCCAAAAGGGCAGTC-3' representando o primer "forward" e 5'-GCCGTTGCTGGAGGAAATTC-'3 representando o primer "reverse". Para melhorar a performance dos primers, foi feita a optimizações desses através de qPCR (quantitative Polimerase Chain Reaction) com o seguinte ciclo: 5 minutos a 95ºC para a desnaturação da fita dupla de DNA, variação de 55 a 60ºC por 30 segundos para o anelamento dos primers com as fitas simples de DNA, 72ºC por 60 segundo para que a enzima taqDNA polimerase atuasse na adição de nucleotídeos à fita simples de cDNA por 40 ciclos e, por fim, 72ºC por 3 minutos para que a taqDNA polimerase terminasse de complementar as fitas simples de cDNA das amostras. As amostras, para a etapa de otimização, tinham os reagentes SYBR®

Green, cDNA 1uL de cDNA (50ng uL^{-1}), 2uL de cada primes (*forward* e *reverse*, a 20 uM) e o restante de água pura (HPLC) até completar 25 uL. Por fim, a melhor temperatura que os primers se comportaram foi de 60ºC.

Em seguida, foi realizado o PCR tradicional (MyCycler™, Bio-Rad, EUA), em que foram utilizados os seguintes reagentes: 25uL de EconoTaq® PLUS Green Master Mix, 2uL dos primers forward e reverse (20mM), 1uL de cDNA (50ng uL^{-1}) e o restatante com água pura até completar 50 uL por reação. Os produtos foram submetidos à eletroforese, com solução tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0) e gel de agarose a 1,5% para a separação do cDNA segundo seu tamanho em relação a fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (GeneRuler™1kb DNA Ladder).

A partir das consultas na literatura a respeito da sequencia de nucleotídeos e aminoácidos que compõe a EPSPs, foi estimado o tamanho aproximado das bandas que os primers desenhados deveriam ter quando realizada a eletroforese do produto do PCR tradicional. Além da técnica de eletroforese, as amostras também foram submetidas ao equipamento Fragment Analyzer™ - Advanced Analytical – do qual, pelo mesmo princípio da eletroforese, mostra por meio de seu software o tamanho exato dos fragmentos de DNA amplificados pelo PCR. Vale ressaltar que em cada etapa foram usados primers de referência, sendo eles relativos aos genes que codificam a enzima CCR, ALS e IDH, bem como primes e cDNA de *Amaranthus palmeri* utilizados por Gaines et al. (2010).

As bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose foram recortadas e purificadas através do kit QIAquick®Gel Extraction, seguindo orientações do fabricante, e em seguida enviadas para sequenciamento em departamento especializado da Colorado State University (PMF – Proteomics and Metabolomics Facility). Os resultados do sequenciamento foram analisadoz com a ajuda do software CHROMAS®, e comparou-se os biótipos suscetível e resistente, a partir das quais foram tiradas conclusões sobre mutações nesse gene. Foi utilizado o software online ClustalW2 (LARKIN et al., 2007) para alinhamento das sequencias obtidas com as sequencias encontradas na literatura.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Absorção do herbicida glyphosate nos biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*

Dentre os tratamentos adotados, apenas o tratamento contendo glyphosate isoladamente foi inferior aos demais em relação ao biótipo 34S, do qual todos os demais foram estatisticamente iguais, considerando 5% de probabilidade. Por outro lado, para o biótipo 69R, os tratamentos que proporcionaram melhores absorções foram os contendo sulfato de amônio nas duas menores concentrações e o óleo emulsificante, como pode ser observado pela Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Absorção de ^{14}C-Glyphosate obtido 48 horas após os tratamentos. Fort Collins, 2014

Tratamento	Biótipo 34S	Biótipo 69R
1 – Glyphosate + AMS (0,75)	77,75 ab A	71,99 ab A
2 – Glyphosate + AMS (1,5)	74,92 ab A	73,09 ab A
3 – Glyphosate + AMS (3,00)	80,52 ab B	63,83 bc A
4 – Glyphosate + COC (1%)	79,05 ab A	76,60 a A
5 – Glyphosate + NIS (0,25%)	84,52 a B	73,84 ab A
6 – Glyphosate	71,57 b B	61,17 ab A
CV(%)	6,74	

*Médias de absorção seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Analisando-se o fator biótipo dentro dos tratamentos, foi possível observar diferenças estatísticas quanto à eficiência de um ou outro tratamento do biótipo 34S sobre o biótipo 69R. O tratamento contendo sulfato de amônio na dose de 3,0 kg ha^{-1} ajudou na absorção do glyphosate de uma maneira superior no biótipo 34S em comparação com o biótipo 69R, propiciando um aumento de quase 20% na absorção. Nesse mesmo sentido, o óleo emulsificante também aumentou a absorção do glyphosate pelo biótipo 34S em mais de 10%, comparado com o biótipo 69R e, por fim, também houve menor absorção de glyphosate pelo

biótipo 69R quando comparado com o biótipo 34S com mais de 10 pontos percentuais de diferença.

6.3.2 Translocação do herbicida glyphosate em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*

Na Tabela 6.4 estão descrito os parâmetros das equações obtidas através dos dados da trajetória do ^{14}C-glyphosate, desde sua aplicação na superfície foliar até seu transporte para fora da planta por exsudação. Experimentos que avaliam o movimento do herbicida na planta usam técnicas destrutivas em cada avaliação ao longo do tempo, requerendo unidades experimentais independentes para cada amostragem. Segundo Kniss et al. (2011), cada coleta em determinado tempo (horas após o tratamento) é tipicamente de pouco valor pontual, mas importante para a caracterização do experimento como um todo. Ainda segundo os autores, é comum encontrar na literatura pesquisas que ignoram a estrutura do trabalho como um todo, das quais estas pesquisas utilizam de comparações estatísticas dentro de cada tratamento, como testes de comparações múltiplas. Segundo Cousens (1985), o estudo da absorção de herbicidas na planta deve ser analisado como um todo, já que o intuito de se avaliar destrutivamente as plantas é criar regressões que representem o comportamento dos dados durante todo o ciclo em que o estudo foi conduzido, proporcionando a vantagem de verificação de algum dado em determinado ponto de interesse, e não apenas nas datas da coleta.

Na literatura, existe a predominância do uso de funções do tipo regressão assimptótica para se descrever a absorção de herbicidas nas plantas (BUKUN et al., 2009; DODDS et al., 2007; GRANGEOT; CHAUVEL; GAUVRIT, 2006). Para melhor ilustração dos dados, foi confeccionado gráfico que ilustram a absorção do ^{14}C-glyphosate nos biótipos submetidos ao experimento em questão. A equação adotada foi a seguinte:

$$Y = Amax * (1 - \exp(-b * x)) \tag{6.3}$$

Onde: “Y” é a quantidade de herbicida em porcentagem, “Amax” é a quantidade máxida de herbicida observada, “b” é a declividade da curva quando esta se aproxima de zero,

e “x” é a quantidade de horas passadas da aplicação dos tratamentos. Também foram calculados, por meio das regressões obtidas, o tempo em que leva para 50% e 90% para o herbicida ser absorvido, comparado com o máximo atingido (t_{50} e t_{90}), segundo recomendações de Kniss et al. (2010).

Tabela 6.4 – Parâmetros das equações referentes aos biótipos 34S e 69R, que descrevem as regressões obtidas para absorção foliar, retenção de ^{14}C-glyphosate na folha tratada, retenção nos colmos e translocação para as raízes e valores de t_{50} e t_{90}. Fort Collins, 2014

	Parâmetros*							
	Amáx		b		t_{50}		t_{90}	
	34S**	69R	34S	69R	34S	69R	34S	69R
Absorção	51,34	34,5	0,11	0,13	4,9	5,2	19,0	14,4
Retenção na folha	50,76	67,57	283423,8	0,33	0,2	2,1	0,6	7,1
Retenção nos colmos	12,97	16,03	0,12	0,06	6,1	10,7	18,7	36,6
Translocação para as raízes	11,7	7,66	0,07	0,1	11,4	5,6	33,1	21,0
Exsudação radicular	0,35	0,75	3454492,1	5,5	0,4	0,2	0,2	0,6

Notas: *Parâmetros da equação: Y=Amáx*(1-exp(-b*x)); **Biótipos 34S e 69R

O gráfico da Figura 6.1 representa a absorção do ^{14}glyphosate desde sua aplicação na superfície foliar dos biótipos até às 96 horas após o tratamento. Considerando-se a Tabela 6.4, o biótipo 34S teve absorção máxima de 51,34% do total aplicado, enquanto que o biótipo 69R

teve absorção máxima de 34,5%, totalizando uma diferença de aproximadamente 17%. Koger e Reddy (2005) estudatam tanto a absorção como a translocação de ^{14}C-glyphosate em *Conyza canadenses*, e constataram que o biótipo suscetível absorveu quantidades estatisticamente semelhantes do ingrediente ativo aplicado comparado com o biótipo resistente. Pérez et al. (2007) também encontraram similar absorção de ^{14}C-glyphosate por biótipos resistente e suscetível de *Lolium multiflorum*. Carvalho et al. (2012) observaram que o biótipo suscetível de *Digitaria insularis* absorveu 12% mais ^{14}C-glyphosate que o biótipo resistente, resustados semelhantes aos obtidos na presente pesquisa.

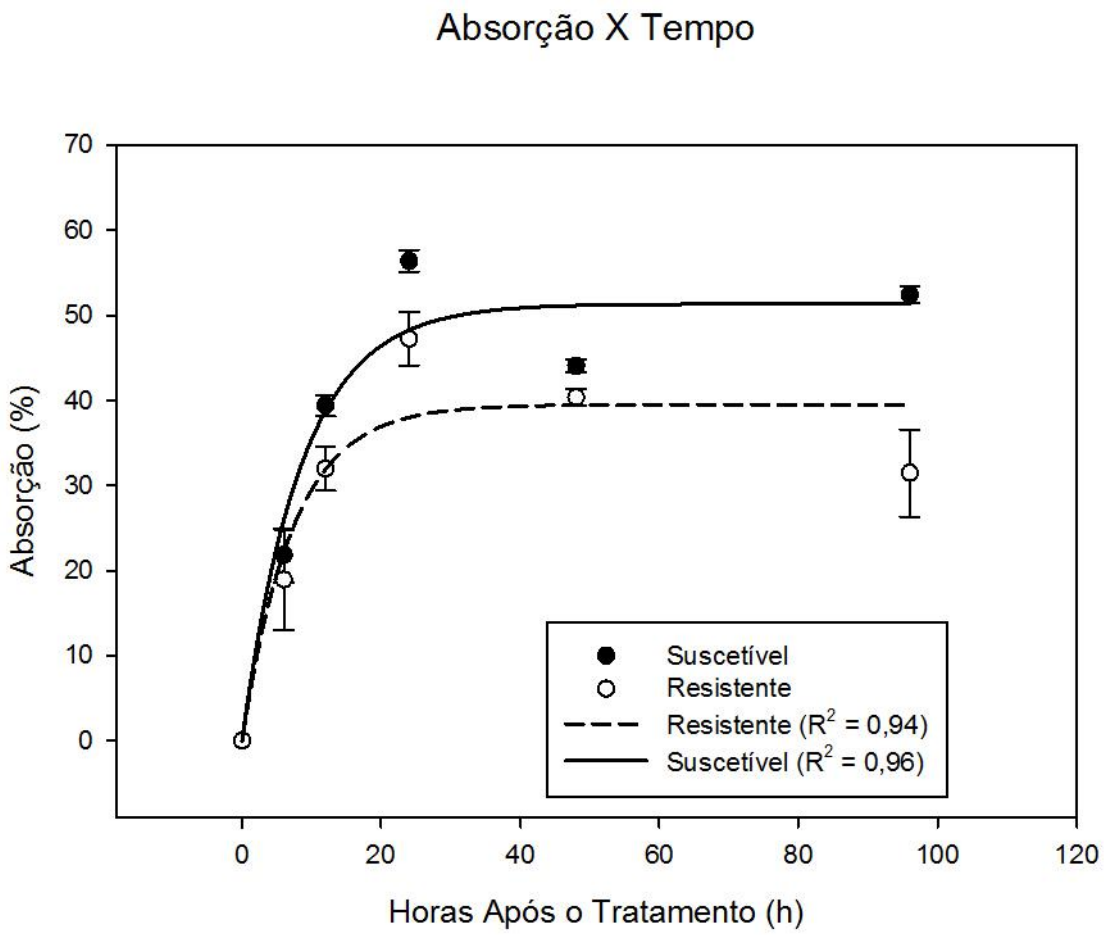

Figura 6.1 – Absorção de ^{14}C-glyphosate nos biótipos 34S e 69R em função do tempo. Fort Collins, 2014

Por outro lado, observando-se os valores dos t_{90} dos biótipos, é possível notar que o 34S precisou de 5 horas a mais para absorver 90% do total de ^{14}C-glyphosate que o biótipo 69R. Esses valores são justificáveis quando os relacionamos com o gráfico da Figura 6.1,

onde o biótipo 34S absorveu maior quantidade de ^{14}C-glyphosate por um período maior que o biótipo 69R, do qual teve seu ápice de absorção poucas horas após os tratamentos.

A figura 6.2 evidencia as médias da coleta realizada às 6 horas após a aplicação, da qual consta das barras verticais que representam a média de cada órgão vegetal, as barras com os erros padrões e, acima, o teste de comparações múltiplas a 5% de probabilidade (Tukey). A partir dessa figura, é possível inferir que os biótipos tiveram retenção de ^{14}C-glyphosate semelhantes estatisticamente, apesar da média dos biótipos terem sido diferentes a 25%, com superioridade de retenção na folha tratada pelo biótipo 69R. Estudando biótipos resistentes e suscetíveis de *Lolium rigidum*, Adu-Yeboah et al. (2014) descobriram que os biótipos resistentes, após 48 horas passadas dos tratamentos, retinham duas vezes mais ^{14}C-glyphosate nas folhas tratadas do que os biótipos suscetíveis, e concluíram que este era o mecanismo de resistência dessa espécia. Riar et al. (2011), estudando biótipos resistentes de *Sorghum halepense*, encontraram maior retenção foliar por parte do biótipo resistente, comparado ao suscetível, com diferença porcentual de 28%.

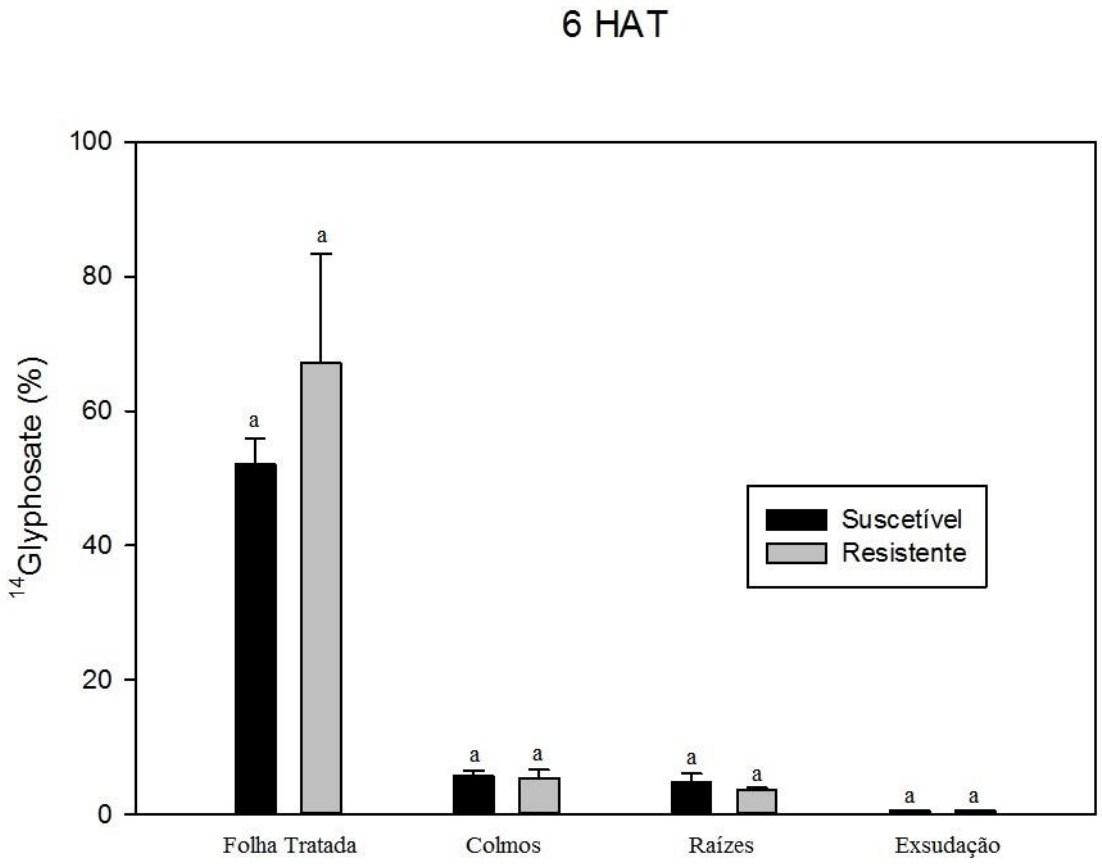

Figura 6.2 – ^{14}C-Glyphosate nos órgãos vegetais 6 horas após a aplicação dos tratamentos. Fort Collins, 2014

Passadas 12 horas da aplicação de ^{14}C-glyphosate, a porcentagem de herbicida retido na folha tratada foi 27% inferior no biótipo 34S comparado ao biótipo 69R, da qual essa diferença foi estatisticamente diferente, conforme é apresentado na Figura 6.3. Os demais órgãos vegetais foram estatisticamente iguais quanto à presença de ^{14}C-glyphosate.

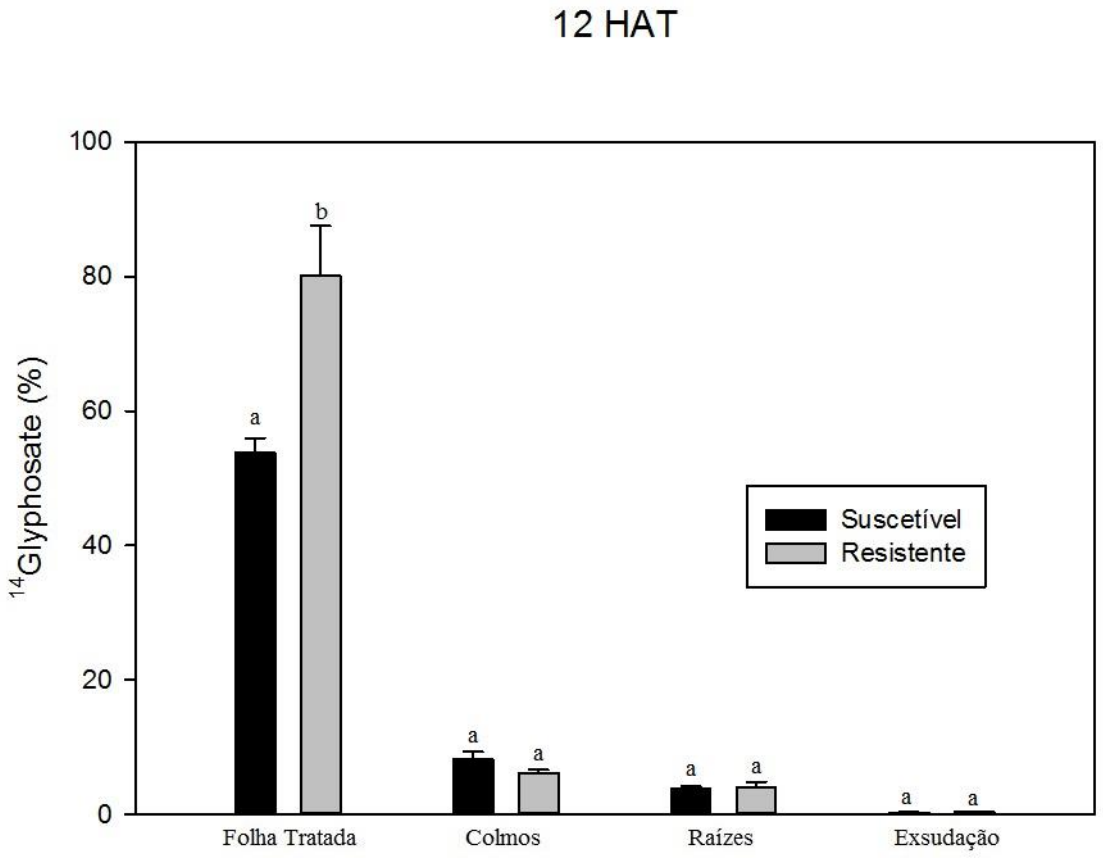

Figura 6.3 – ^{14}C-Glyphosate nos órgãos vegetais 12 horas após a aplicação dos tratamentos. Fort Collins, 2014

A Figura 6.4 ilustra a quantidade de ^{14}C-glyphosate translocado na planta após 24 horas do tratamento. A barra que ilustra o biótipo suscetível, comparando-se com aquela apresentada na figura 6.3, é menor, ao mesmo tempo que as barras que representam os outros órgãos vegetais são maiores, o que indica a translocação do herbicida pela planta. Este fato também ocorre com o biótipo 69R, contudo, este ainda possui retenção estatisticamente superior quando comparado com o biótipo 34S.

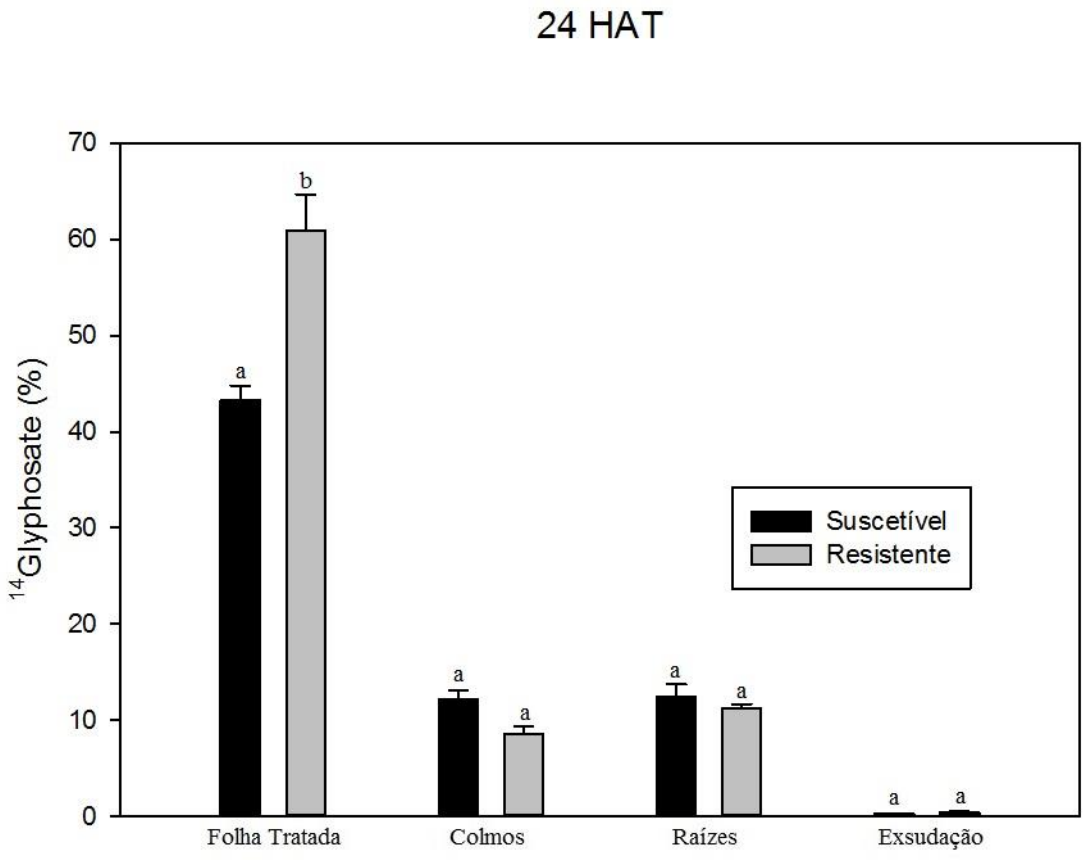

Figura 6.4 – ^{14}C-Glyphosate nos órgãos vegetais 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Fort Collins, 2014

Passadas 48 horas da aplicação do ^{14}C-glyphosate (Figura 6.5), ainda é possível notar superioridade estatística de retenção na folha tratada por parte do biótipo 69R, da qual a diferença média foi de 24%, enquanto que a retenção na folha tratata pelo biótipo 34S não foi diferente, o que pode ser um indicativo da diminuição das atividades fisiológicas desse biótipo, uma vez que o herbicida já se encontra espalhado completamente por toda a planta. Esses resultados são similares aos encontrados por Koger e Reddy (2005), que encontraram retenção foliar 28% maior no biótipo resistente de *Conyza canadenses* do Mississippi após 48 horas do tratamento dos biótipos com ^{14}C-glyphosate, dos quais concluíram ser a retenção foliar diferencial o mecanismo de resistência dessa espécie ao glyphosate. A quantidade de ingrendiente ativo encontrada nos colmos é também estatisticamente diferente entre os biótipos, do qual o biótipo 69R teve a habilidade de reter maior herbicida, e dessa forma, mantê-lo distante dos órgãos meristemáticos, onde o herbicida glyphosate tem maior atuação (WEAVER; HERMANN, 1997).

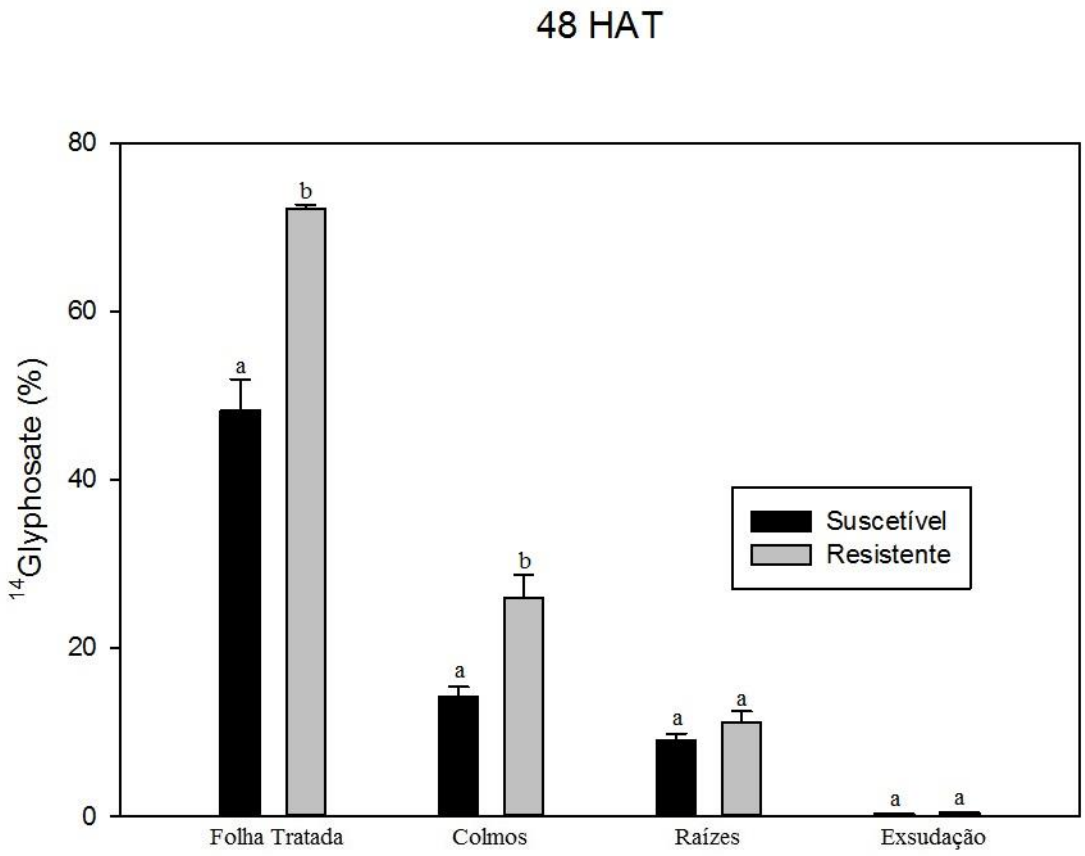

Figura 6.5 – ^{14}C-Glyphosate nos órgãos vegetais 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Fort Collins, 2014

Por fim, a figura 6.6 ilustra a distribuição do ^{14}C-glyphosate nos biótipos 34S e 69R. Nessa avaliação, não foi possível verificar diferenças estatísticas na retenção foliar devido à variação que houve dentro do biótipo 69R. Entretanto, a média deste é 11% maior comparada ao biótipo 34S, quando analisada a retenção de herbicida na folha tratada. Também não houve diferença estatística entre os biótipos quando analisados a presença de ^{14}C-glyphosate nos colmos, raízes e exsudação. Quando é realizada uma analise mais detalhada dos dados, é possível perceber que, da avaliação de 48 horas após o tratamento para a de 96 horas após o tratamento, no biótipo 34S, houve diminuição média de 2% no ^{14}C-glyphosate encontrado nos colmos, enquanto que o herbicida encontrado nas raízes aumentou 2%, e, juntamente com as pequenas barras de erro padrão, podem indicar alta acuracidade dos dados.

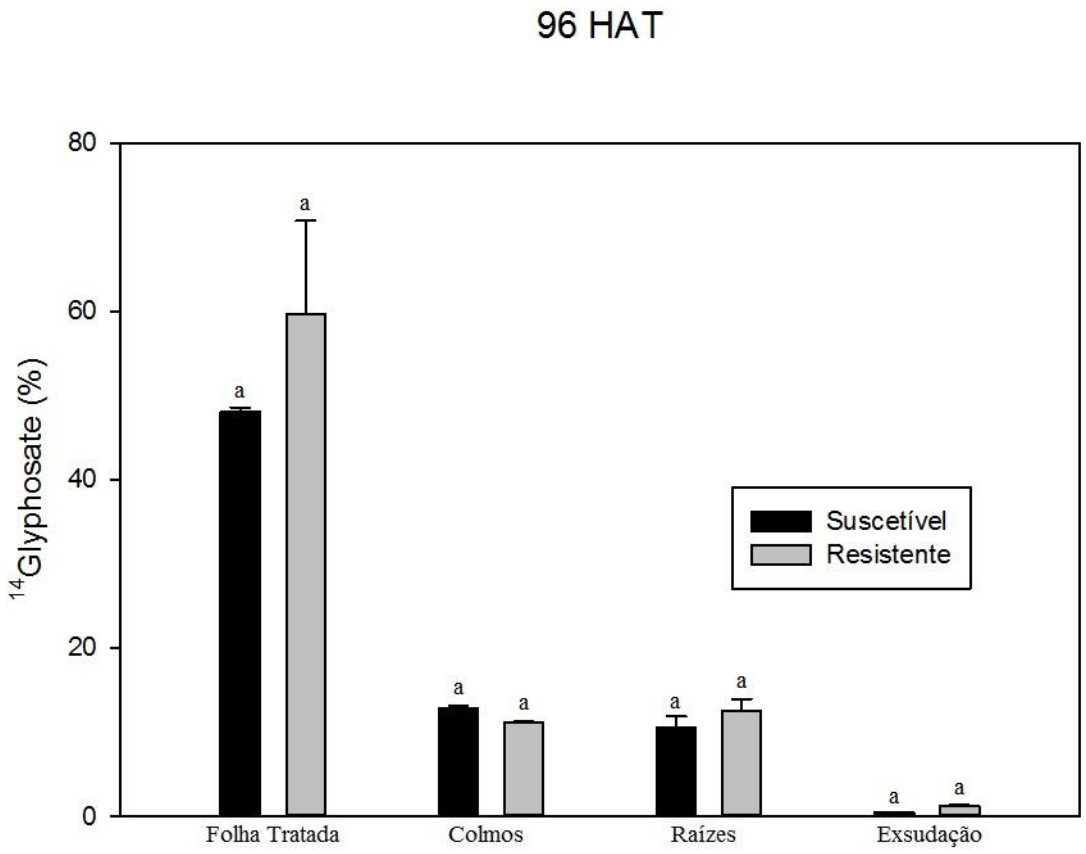

Figura 6.6 – ^{14}C-Glyphosate nos órgãos vegetais 96 horas após a aplicação dos tratamentos. Fort Collins, 2014

6.3.3 Acúmulo de ácido chiquímico em biótipos resistente e suscetível ao glyphosate

Os resultados do acúmulo de ácido chiquímico são apresentados na Figura 6.6. Inicialmente, é perceptível a maior acumulação de ácido chiquímico no biótipo suscetível, uma vez que o mecanismo de ação do glyphosate causa a inibição de compostos que teriam o ácido chiquímico incorporado, fazendo com que o ácido chiquímico não seja utilizado e se acumule nos tecidos vegetais (GEIGER; FUCHS, 2002). Segundo revisão realizada por Shaner (2009), existem duas principais formas em que o glyphosate pode entrar na célula vegetal: uma seria baseada em um sistema ativo, podendo ter a ajuda de um carreador, e outra é realizada passivamente. Plantas de *Catharanthus roseus*, *Zea mays*, *Glycine max* e *Vicia faba*, foram submetidas a aplicações de glyphosate e mostraram que, a baixas concentrações, a entrada do glyphosate na célula podia ocorrer contra o gradiente de concentração que varia entre 3 a 50uM (DENIS; DELROR, 1993). Acima de 50uM, o glyphosate teve entrada linear

na célula comparada com a concentração externa, mesmo com a adição de moléculas competidoras na entrada deste na célula, como fosfato de sódio. Este fato pode explicar o comportamento linear do acúmulo de ácido chiquímico nesse experimento, uma vez que, pela Figura 6.7, pode-se perceber que houve um drástico aumento de seu acúmulo quando a dose aumentou para 1080 g e. a. ha^{-1}.

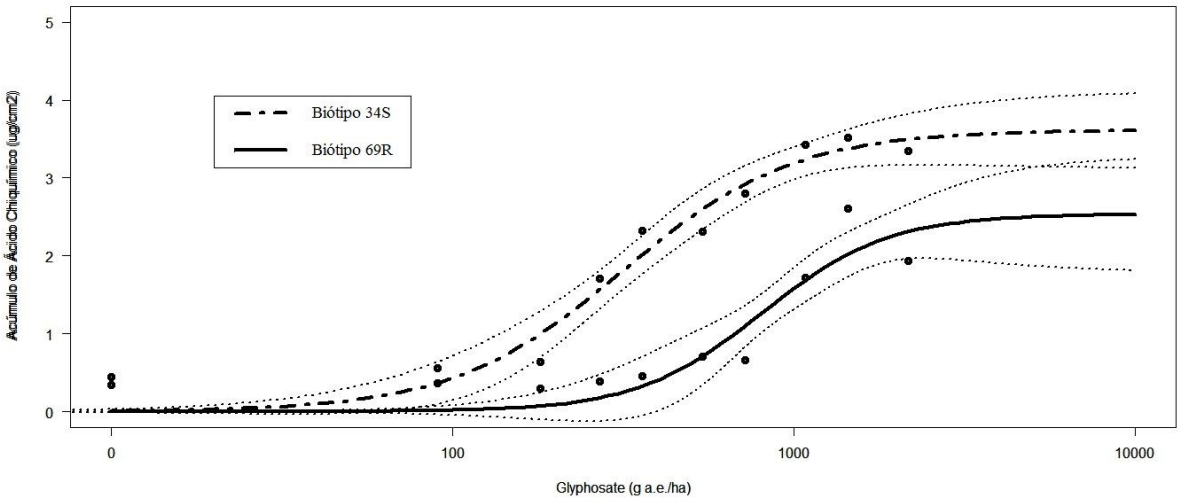

Figura 6.7 – Acúmulo de ácido chiquímico em biótipos de capim-branco. Fort Collins, 2014

Tabela 6.5 – Parâmetros da equação que representa o acúmulo de ácido chiquímico e aplicação de glyphosate em biótipos de capim-branco. Fort Collins, 2014

Parâmetro*	**b**	**SE****	**d**	**SE**	**e*****	**SE**	**FR******
Biótipo 34S	-2,36	0,88	2,53	0,36	806,09	129,08	2,56
Biótipo 69R	-1,74	0,35	3,61	0,24	314,61	39,21	

Notas: *Equação Y=d/{1 + exp[b(log x – log e)]}, ** Erro padrão em quatro repetições, baseado em um intervalo de confiança de 95%. ***Quantidade de herbicida necessária para aumentar o acúmulo de ácido chiquímico em 50%. ****Fator de resistência (GR_{50r}/GR_{50s}).

Segundo Shaner et al. (2005), esse método pode ser utilizado para a identificação da presença de plantas daninhas resistentes ao glyphosate na área ainda no início da safra, fato este que ajuda na tomada de decisão do manejo ainda a tempo de serem tomadas atitudes reativas. Ainda segundo os autores, esse método é rápido e pode ser usado tanto em plantas provenientes de casa de vegetação (utilização experimental) como plantas coletadas

adequadamente no campo, sendo eficiente para a comprovação da resistência nas mais variadas espécies. Através dos resultados aqui apresentados, este método foi eficiente para a confirmação da resistência do biótipo 69R ao glyphosate, do qual apresentou um fator de resistência (GR_{50r}/GR_{50s}) de 2,56, conforme apresentado na Tabela 6.5. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Melo (2011), que avaliou o acúmulo do ácido chiquímico em biótipos de *Digitaria insularis*.

6.3.4 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Chloris polydactyla*

A Figura a seguir (Figura 6.8) ilustra as bandas obtidas de cDNA de cinco repetições de ambos os biótipos, que posteriormente foram mandadas para sequenciamento. Conforme esperado, baseando-se nos primers desenhados, o fragmento do gene que codifica a EPSPs deveria ter por volta de 200 pares de bases.

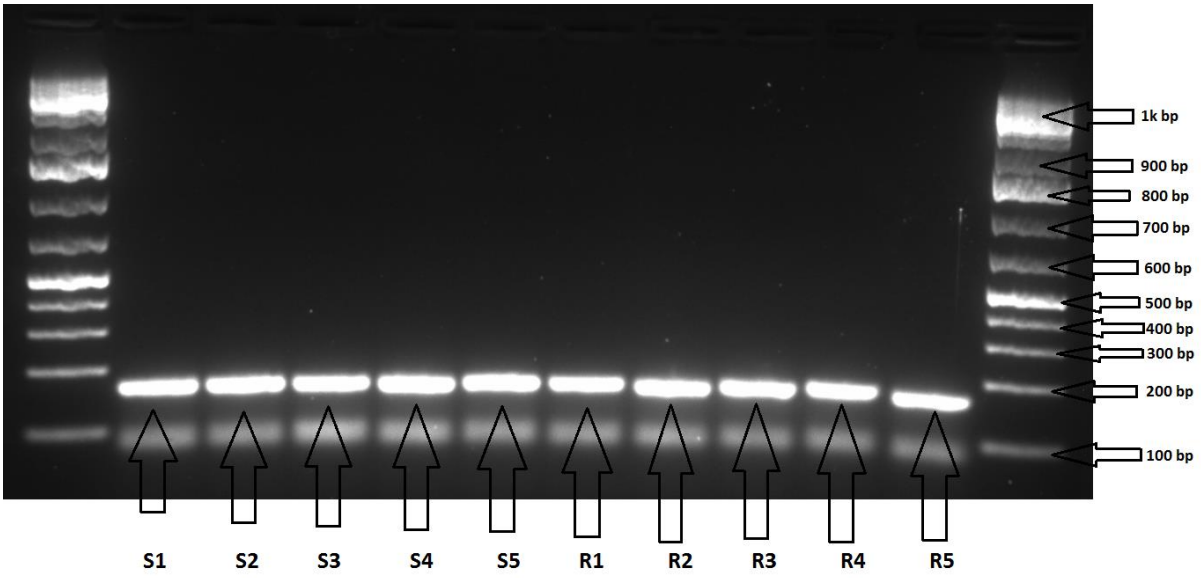

Figura 6.8 – Gel de agarose (1,5%) com as bandas obtidas de cDNA referentes a um fragmento do gene que codifica a EPSPs dos biótipos 34S e 69R. Fort Collins, 2014

Através da Figura a seguir (Figura 6.9), que mostra o alinhamento de um seguimento do gene que codifica a EPSPs, é possível perceber que não existe mutação nem na posição 106, posição esta ocupada por um aminoácido prolina, nem em outras posições dessa sequencia de aproximadamente 120 pares de bases, como por exemplo na posição 102, que também pode propiciar menor suscetibilidade do indivíduo ao glyphosate. As diferenças existentes, representadas pela ausência de um asterisco na parte debaixo da sequência, mostram as mutações que ocorrem entre a espécie azevém (*Lolium multiflorum*) e os biótipos de capim-branco, mas não é possível visualizar diferenças entre as sequências dentro dos biótipos.

```
CHRPO_S         CTTGGGGAATGCTGGAACGGCAATGCGGCCATTGACAGCAGCCGTAACTGCTGCTGGAGG
CHRPO_R         CTTGGGGAATGCTGGAACGGCAATGCGGCCATTGACAGCAGCCGTAACTGCTGCTGGAGG
LOLMU           CTTGGGCAACGCTGGAACTGCAATGCGGCCATTGACGGCTGCTGTAGTAGCTGCTGGTGG
                ****** ** ******** ***************** ** ** ***   ******** **

CHRPO_S         AAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCCATTGGCGACTT
CHRPO_R         AAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCCATTGGCGACTT
LOLMU           AAATGCGACTTATGTTCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGCGACCTACCGGTGACTT
                ****** ******** *********** ********* ***** **** *  ** *****
```

Figura 6.9 – Sequência de nucleotídeos dos biótipos 34S e 69R que codifica a EPSPs e a posição 106 destacada. Fort Collins, 2014

Existem dois tipos de EPSPs documentadas na literatura, baseadas conforme sua sensibilidade ao glyphosate: a classe I é encontrada em todas as plantas e em bactérias como a *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, e sua atividade é inibida sob baixas concentrações de glyphosate (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). A EPSPs classe II, encontrada em algumas espécies de bactérias, inclusive a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniai* e *Agrobacterium* sp. Strain CP4, são dotadas da habilidade de continuar sua atividade catalítica mesmo na presença de altas concentrações do herbicida em questão (DILL; JACOB; PADGETTE, 2008; FUNKE et al., 2005; PRIESTMAN et al., 2005).

A insensibilidade ao glyphosate por algumas plantas com a enzima classe I pode ser alcançada por seleção natural ou artificialmente. Partindo-se de que o glyphosate e o fosfoenolpiruvato (PEP) se ligam no mesmo local na EPSPs, é esperado que os mutantes que

possuem a mutação nessa posição tenham tanto menor afinidade PEP quanto pelo glyphosate (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Algumas mutações pontuais como a substituição de uma treonina por uma metionina na posição 47 (HE; NIE; XU, 2003), substituição de um glicina por uma alanina na posição 101 (PADGETTE et al., 1991) e prolina por uma serina na posição 106 (STALKER; HIATT; COMAI, 1985) podem resultar em menor afinidade ao glyphosate, mas não suficiente para suportar altas dosagens deste herbicida. Por outro lado, a mutação de uma treonina por uma isoleucina na posição 102, juntamente com a mutação de uma prolina por uma serina na posição 106, também conhecida como mutação "TRIS", pode habilitar os indivíduos a receber altas quantidades de glyphosate, conhecimento este que propiciou a sua utilização artificialmente em culturas geneticamente modificadas.

6.4 Conclusões

O biótipo 69R teve absorção inferior ao biótipo 34S. O tratamento que proporcionou maior absorção de ^{14}C-glyphosate aquele com a adição de surfactante não-iônico.

O biótipo 34S absorveu 17% maior quantidade de ^{14}C-glyphosate, quando comparado ao biótipo 69R. Além disso, o biótipo 69R reteve até 27% mais glyphosate na folha tratada em comparação com o biótipo 34S, sendo o possível mecanismo de resistência desse biótipo ao glyphosate.

O biótipo 34S acumulou 2,56 vezes mais ácido chiquímico do que o biótipo 69R.

O sequenciamento do gene que codifica a EPSPs mostrou não haver mutação na prolina 106, ou outro tipo de mutação na sequência analisada desse gene.

Referências

ADU-YEBOAH, P.; MALONE, J. M.; GILL, G.; PRESTON, C. Reduced translocation in two glyphosate-resistant populations of Rigid Ryegrass (Lolium rigidum) from fence lines in south Australia. **Weed Science**, Lawrence, v. 62, p. 4-10, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Graland Science, 2007. 1392 p.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate, II: interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 66, p. 830–834, 1980.

ARNAUD, L.; NURIT, F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Distribution of glyphosate and of its target enzyme inside wheat plants. **Pesticide Science**, Malden, v. 40, p. 217–223, 1994.

ARNTZEN, C.J.; PFISTER, K.; STEINBACK, K.E. The mechanism of chloroplast triazine resistance: alterations in the site of herbicide action. In: LEBARON, H.M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Herbicide resistance in plants**. New York: Wiley, 1982. p. 185–214.

BAKKALI, Y.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; OSUNA, M.D.; WAGNER, J.; FISHER, A.J.; DO PRADO, R.D. Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food and Chemistry**, Davis, v. 55, p. 4052–4058, 2007.

BUKUN, B.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; WESTRA, P.; BRUNK, G.; SHANER, D.L.; SLEUGH, B.B.; PETERSON, V.F. Aminopyralid and clopyralid absorption and translocation in Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 10-15, 2009.

CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; ROJANO-DELGADO, A.M.; DE PRADO, R. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, p. 615-622, 2012.

COUSENS, R. Misinterpretations of results in weed research through inappropriate use of statistics. **Weed Research**, Oxford, v. 28, p. 281-289, 1985.

DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, Malden, v. 69, p. 176-187, 2011.

DÉLYE, C.; WANG, T.Y.; DARMENCY, H. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. **Planta,** Berkeley, v. 214, p. 421–427, 2002.

DILL, G.M.; JACOB, C.A.; PADGETTE, S.R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, Malden, v. 54, p. 326-331, 2008.

DODDS, D.M.; REYNOLDS, D.B.; MASSEY, J.H.; SMITH, M.C.; KOGER, C. H. Effect of adjuvants and urea ammonium nitrate on bispyribac efficacy, absorption, and translocation in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*), II: absorption and translocation. **Weed Science,** Lawrence, v. 55, p. 406-411, 2007.

FENG, P.C.C.; CHIU, T.; SAMMONS, R.D. Glyphosate efficacy is contributed by its tissue concentration and sensitivity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 77, p. 83–91, 2003.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **Glyohosate:** a unique global herbicide. Washington: American Chemical Society. 1997. 678 p.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEARLY-FRIED, M.L.; FISHER, M.; SCHONBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p. 13010-13015, 2005.

FUNKE, T.; YANG, Y.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M.; OLESEN, S.; BECKER, A. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 ->Ile and Pro 101 -> Ser in 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Syntase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Fort Collins, v. 284, n. 15, p. 9854-9860, 2009.

GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, p. 1029–1034, 2010.

GEIGER, D.R.; FUCHS, M.A. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (Ed.). **Herbicide classes in development**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 59-85.

GIBSON, J.A.B. Modern techniques for measuring the quench correction in a liquid scintillation counter. In: PENG, C.T.; HORROCKS, D.L.; ALPEN, E.L. (Ed.). **Liquid scintillation counting:** recent applications and developments. New York: Academic Press, 1980. p. 153-172.

GRANGEOT, M.B.; CHAUVEL, B.; GAUVRIT, C. Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 152-162, 2006.

HE, M.; NIE, Y.F.; XU, P. A T42M substitution in bacterial 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) generates enzymes with increased resistance to glyphosate. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, p. 1405-1409, 2003.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. 2014. Disponível em: <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 07 abr. 2014.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale – general for descriptions pf the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, p. 433-441, 1997.

JONES, R.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; WAALAND, S. **The molecular life of plants**. Portland: Wiley, 2012. 742 p.

KAUNDUN, S.V.; ZELAYA, I.A.; DALE, R.P.; LYCETT, A.J.; CARTER, P.; SHARPLES, K.R.; MCINDOE, E. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Phillippines. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 637–646, 2008.

KNEZEVIC, S.Z.; STREIBIG, J.C.; RITZ, C. Utilizing R software for dose-response studies: the concept and data analysis. **Weed Technology**, Lawrence, v. 21, p. 840-848, 2007.

KNISS, A.R.; VASSIOS, J D.; NISSEN, S.J.; RITZ, C. Nonlinear regression analysis of herbicide absorption studies. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 601-610, 2010.

KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 53, p. 84-89, 2005.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, M.A.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Cluslatl W and clustal X version 2.0, **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LASAT, M.M.; DITOMASSO, J.M.; HART, J.J.; KOCHIAN, L.V. Resistance to paraquat in *Hordeum glaucum* is temperature dependent and not associated with enhanced apoplastic binding. **Weed Research**, Oxford, v. 36, p. 303–309, 1996.

LASAT, M. M.; DITOMASO, J. M.; HART, J. J.; KOCHIAN, L. V. Evidence for vacuolar sequestration of paraquat in roots of a paraquat-resistant *Hordeum glaucum* biotype. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 99, p. 255–262, 1997.

LYDON, J.; DUKE, S.O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 36, p. 813–816, 1988.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate.** 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MOSS, S.R.; CUSSANS, G.W. Variability in the susceptibility of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) to chlortoluron and isoproturon. **Aspects of Applied Biology**, Los Angeles, v. 9, p. 91–98, 1985.

PADGETTE, S.R.; RE, D.B.; GASSER, C.D.; EICHHOLTZ, D.A.; FRAZIER, R.B.; HIRONAKA, C.M.; LEVINE, E.B.; SHAH, D.M.; FRALEY, R.T.; KISHORE, G. M.Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. **The Journal of Biological Chemistry**, Fort Collins, v. 266, p. 22364-22369, 1991.

PÉREZ, A.; ALISTER, C.; KOGAN, M. Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resistant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. **Weed Biology and Management**, Malden, v. 4, p. 56-58, 2004.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berkeley, v. 226, p. 395-404, 2007.

PRESTON, C.; TARFI, F.J.; CHRISTOPHER, J.T.; POWLES, S.B. Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Massachusetts, v. 54, p. 123–134, 1996.

PRESTON, C.; SOAR, C.J.; HIDAYAT, I.; GREENFIELD, K.M.; POWLES, S.B. Differential translocation of paraquat in paraquat-resistant population of *Hordeum leporinum*. **Weed Research**, Oxford, v. 45, p.289-295, 2005.

PRESTON, P.; WAKELIN, A.M.; DOLMAN, F.C.; BOSTAMAN, Y.; BOUTSALIS, P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 435-441, 2009.

PRIESTMAN, M.A.; FUNKE, T.; SINGH, I.M.; CRUPPER, S.S.; SCHONBRUNN, E. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 579, p. 728-732, 2005.

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; JOHNSON, D.B.; SCOTT, R.C.; BAGAVATHIANNAN, M. Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 299-304, 2011.

RITZ, C.; STREIBIG, J.C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 12, n. 5, p. 1-21, 2005.

SHANER, D.L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, W.B.; KOGER, C.H. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, Lawrence, v. 53, p. 769-774, 2005.

SHANER, D.L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 118-123, 2009.

SOAR, C.J.; KAROTAM, J.; PRESTON, C.; POWLES, S.B. Reduced paraquat translocation in paraquat resistant *Arctotheca calendula* (L) Levyns is a consequence of the primary resistance mechanism, not the cause. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Massachusetts, v. 76, p. 91–98, 2003.

STALKER, D.M.; HIATT, W.R.; COMAI, L. A single amino acid substituition in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. **The Journal of Biological Chemistry**, Fort Collins, v. 260, p. 4724-4728, 1985.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Lawrence, v. 50, p. 700-712, 2002.

VÁRADI, G.; DARKÓ, É. LEHOCZKI, E. Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the

mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* (L.) Cronq. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 123, p. 1459-1469, 2000.

WAKELIN, A.M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 432–440, 2006.

WEAVER, L.M.; HERMANN, K.M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends in Plant Science,** Cambridge, v. 2, p. 346–351, 1997.

YU, Q.; CAIRNS, A.; POWLES, S.B. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta**, Berkeley, v. 225, p. 499-513, 2007.

YU, W.; CAIRNS, A.; POWLES, S.B. Paraquat resistance in a biotype of *Lolium rigidum*. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 247-254, 2004.

YUAN, J.S.; TRANEL, P.J.; STEWART JR., A.N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2006.

ZAGNITKO, O.; JELENSKA, J.; TEVZADZE, G.; HASELKOM, R.; GORNICKI, P. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 6617-6622, 2001.

ANEXO

USDA United States Department of Agriculture
APHIS Animal and Plant Health Inspection Service
Plant Protection & Quarantine
4700 River Road
Riverdale, Maryland
20737-1236

April 28, 2014

Re: P587-140411-018

Scott Nissen
Colorado State University
115 Weed Research Lab
Colorado State University
Fort Collins, Colorado 80523-1179

Dear Scott Nissen:

This letter is in response to your recent application to import ***Chloris spp., and Digitaria spp., seeds from Brazil and various approved countries.*** We are pleased to inform you that these seeds do not require a permit from Plant Protection and Quarantine (PPQ) Plant Health Programs under current U.S. plant quarantine regulations (7 CFR 319.37). Please have a copy of this letter accompany each shipment.

All propagative material must be accompanied by a phytosanitary certificate. Upon arrival in the United States, the plant materials will be subject to inspection by representatives of Customs and Border Protection, Agriculture Quarantine Inspection or PPQ. Each lot must be accurately labeled as to kind, variety, origin, lot designation, and treatment if any. Each lot of seed will be sampled at the port of entry and inspected for noxious weed seeds and other pests.

For further information about seed for planting visit our website at:
http://www.aphis.usda.gov/plant_health/permits/plants_for_planting.shtml

For additional questions, call our automated phone system at: 1-877-770-5990.

Sincerely,

Carolyn F. Fitzgerald

Carolyn Fitzgerald
Permit Program Specialist
APHIS Plant Health Programs
Plant Protection and Quarantine