**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta
daninha *Lolium multiflorum* (Lam.)**

Daniela Neves Ribeiro

**Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

**Piracicaba
2008**

Daniela Neves Ribeiro
Engenheiro Agrônomo

Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha
***Lolium multiflorum* (Lam.)**

Orientador:

Prof. Dr. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI

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

Piracicaba

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Ribeiro, Daniela Neves

Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha
Lolium multiflorum (Lam.) / Daniela Neves Ribeiro. - - Piracicaba, 2008.
102 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Herbicidas – Resistência 2. Modelagem de dados 3. Plantas daninhas I. Título

CDD 632.58

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

“Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece”. (Filipenses 4:13)

Deus, muito obrigada!

OFEREÇO

Aos meus pais Marcelo e Maria Cecília, por me mostrarem o caminho certo.

Aos meus avós Hélio, Cecília, Ribeiro (*in memorian*) e Dinorah, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado Wagner, pelo companheirismo, amor e compreensão em meu projeto de vida.

A você... Leitor... Boa leitura!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de forma direta ou indireta contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela orientação, oportunidade e pelas contribuições à minha formação acadêmica.

À CAPES pela bolsa de estudos fornecida para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Rafael De Prado Amián pela oportunidade e orientação na execução da tese.

Al Dr. José (Joselito) por el auxilio en los análisis estadísticos, por la solidaridad y por la amistad.

Ao Dr. Leandro Vargas pela disponibilidade do material vegetal estudado e pelas sugestões na execução deste trabalho.

Ao Dr. Durval Dourado Neto pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação à Universidade e pela paciência.

Ao Dr. Fábio Andrade pela paixão a profissão, pelo exemplo de vida, por acreditar no próximo e por me orientar no maravilhoso mundo das ciências agrárias.

Ao Dr. Ribas Vidal pela valiosa colaboração, pelo amor a profissão e pela amizade.

Ao Dr. Valdemar Tornisielo pela confiança, pela amizade, pelo apoio irrestrito e pelo profissionalismo.

Ao Dr. Antonio Heredia pela valiosa colaboração nas análises de ceras epicuticulares.

À equipe do prof. Elliot Kitajima pelo apoio e contribuição nas análises de caracterização da superfície foliar.

À amiga Laís Eduardo, por sempre estar ao meu lado, pela compreensão, por dar sem querer receber e, acima de tudo, por ser a melhor amiga do mundo!

À amiga e colega de mestrado Bianca Martins (Magali), por todos os momentos compartilhados, pelos conhecimentos trocados, cumplicidade e companheirismo. A união faz a força!

Ao amigo e colega de mestrado Saul Carvalho, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e pela colaboração na redação final deste trabalho. Só mais uma pergunta!

Ao amigo e colega de mestrado Eric Espinoza, pelo tempo disponibilizado e por me ajudar com o idioma espanhol. ¡Muchas gracias!

Ao meu fiel escudeiro, meu cachorro Ice, pelo companheirismo incondicional durante a redação deste trabalho.

Aos amigos: Ana Carlina Roso, Bruna, Caio, Érika (Tiq's), Flávia (Rod's), Gláucia (Kibi), Helga, Heloísa (Bit's), Manú, M^a Elda (Tana), Paulinho, Rafael (Orelha), Renata (Taqua's), Renée, República Quartel, Sarah e Sabrina. Amigos são para sempre!

Aos amigos e redatores deste trabalho, Eduardo Girardi e Carlos Ragassi.

Aos amigos Márcio, Greice, Nalva e Josué, por abrir as portas de suas casas e confiar na minha amizade.

Los compañeros del trabajo Antonia, Daniel, Hugo, Jesús, Juan Pedro, Paola, Rafaelito, por la ayuda y por los momentos de alegría.

Los amigos Emanuela, Gastón, Laura, Laura italiana (hermanita), Lorena, Mauricio, Mel, Nádia, Oriol, Paloma, Plínia, Soraya, Vincenzo, Victorio, sien vosotros la España no tendería sido la misma.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação: Ana Carolina Dias, Francisco, Hector, Livia, Marcelo Nicolai, Marcelo (Paraná), Murilo Moreira, Rafael Vivian, Vanessa Cardinali e Victor.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ/USP, Eliana Garcia, M^a Célia Marcone, Silvia Zinsly, Silvio Bacheta e Vilma Zeferino, por serem exemplo de profissionalismo.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP: Luciane, Bete, Célia, Helena e Ilze pela amizade e apoio.

Aos amigos que por ventura tenha esquecido.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
Referências	15
2 TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE <i>Lolium</i> spp. RESISTENTES A HERBICIDA GLYPHOSATE	19
Resumo	19
Abstract.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Material e métodos	22
2.2.1 Testes com germinação em placa de Petri.....	22
2.2.2 Curva de dose-resposta por meio do cultivo em vasos.....	23
2.2.3 Bioensaio de determinação <i>in vivo</i> de ácido shiquímico.....	23
2.2.4 Determinação da taxa de fotossíntese líquida.....	24
2.2.5 Análise estatística	25
2.3 Resultados e discussão	26
2.3.1 Testes com germinação em placa de Petri.....	26
2.3.2 Curva de dose-resposta por meio do cultivo em vasos.....	28
2.3.3 Bioensaio de determinação <i>in vivo</i> de ácido shiquímico.....	30
2.3.4 Determinação da taxa de fotossíntese líquida.....	31
2.3.5 Comparação entre os testes.....	33
2.4 Conclusões.....	34
Referências	35
3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLYPHOSATE EM <i>Lolium multiflorum</i>	39
Resumo	39
Abstract.....	40
3.1 Introdução.....	41
3.2 Material e métodos	43
3.2.1 Bioensaio de determinação acumulativa de ácido shiquímico	44

3.2.2 Bioensaio de determinação dos efeitos fisiológicos	45
3.2.3 Caracterização das ceras epicuticulares	46
3.2.4 Caracterização da superfície foliar	47
3.2.5 Estudos de absorção e translocação do glyphosate	47
3.2.6 Análise estatística	48
3.3 Resultados e discussão	49
3.3.1 Bioensaio de determinação acumulativa de ácido shiquímico	49
3.3.2 Bioensaio de determinação dos efeitos fisiológicos	50
3.3.3 Caracterização das ceras epicuticulares	53
3.3.4 Caracterização da superfície foliar	55
3.3.5 Estudos de absorção e translocação do glyphosate	56
3.4 Conclusões	62
Referências	62
4 MODELAGEM DOS ESTUDOS DE DOSE-RESPOSTA AOS HERBICIDAS: UMA NOVA PROPOSTA.....	70
Resumo	70
Abstract	71
4.1 Introdução	72
4.2 Material e métodos	73
4.2.1 Descrição dos estádios fenológicos	73
4.2.2 Procedimento experimental	73
4.2.3 Desenvolvimento dos modelos	75
4.2.3.1 Modelagem dos estudos de dose-resposta ao herbicida	75
4.2.3.1.1 Modelagem bidimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida.....	76
4.2.3.1.2 Modelagem tridimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida	76
4.2.3.2 Modelo proposto para estudos de dose-resposta ao herbicida.....	77
4.3 Resultados e discussão	79
4.3.1 Modelagem dos estudos de dose-resposta ao herbicida	79
4.3.1.1 Modelagem bidimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida.....	80
4.3.1.2 Modelagem tridimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida	82
4.3.2 Modelo proposto para estudos de dose-resposta ao herbicida.....	84

4.4 Conclusões.....	97
Referências	97
5 CONCLUSÕES	101

RESUMO

Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha *Lolium multiflorum* (Lam.)

Com o objetivo de caracterizar a resistência ao glyphosate em *Lolium multiflorum* (azevém) foi desenvolvida a pesquisa para: (a) testar a efetividade dos testes de dose-resposta em placas de Petri e em vasos, de acumulação *in vivo* de ácido shiquímico e de comportamento da fotossíntese líquida, como metodologia de detecção da resistência ao glyphosate em *Lolium* spp.; (b) caracterizar os mecanismos que conferem a resistência ao glyphosate em azevém e; (c) modelar a relação entre os biótipos susceptível (S) e resistente (R) ao glyphosate por meio de duas variáveis independentes (doses do herbicida e estádios fenológicos) e propor um modelo de predição da resistência ao glyphosate. A avaliação dos testes de detecção permitiu concluir que todos os testes foram adequados para identificar os biótipos resistentes. Na caracterização dos mecanismos de resistência, experimentos foram instalados para analisar o padrão de acúmulo de ácido shiquímico, o comportamento das variáveis fisiológicas e a composição das ceras epicuticulares, assim como, caracterizar a superfície foliar, a absorção e a translocação do ^{14}C -glyphosate. As conclusões foram: as variáveis caracterização da absorção e quantificação e composição química das ceras epicuticulares, não apresentaram distinção entre R e S; todavia, o padrão de distribuição dos tricomas em pares em R difere da distribuição individualizada em S, assim como a translocação do glyphosate foi maior em direção as regiões que não receberam o tratamento no biótipo R. O movimento do glyphosate pelo floema segue a mesma rota dos produtos fotoassimilados sendo diretamente proporcional ao transporte dos carbonos assimilados, como se constatou em R que manteve a taxa de fotossíntese líquida constante durante o experimento. Os baixos níveis de acúmulo de ácido shiquímico constatados em R indicam que o glyphosate não é totalmente inibido de atuar na EPSPs ou que a EPSPs pode ser parcialmente inibida pelo herbicida, permanecendo na forma ativa. Desta forma, a resistência do azevém ao glyphosate, provavelmente, não é atribuída a um único mecanismo de resistência, assim como a maior translocação do herbicida no biótipo R representa um dos prováveis mecanismos que confere resistência. Nos estudos de modelagem, o modelo não-linear que proporcionou uma descrição precisa da relação entre a variável dependente e as variáveis independentes foi a seguinte equação: $z = a / \{ [1 + [(x-b)/c]^2] \cdot [1 + [(y-d)/c]^2] \}$, onde z representa a fitomassa fresca relativa (%) na dose x do herbicida; y é o estágio fenológico (número de perfilhos, Np) e a , b , c e d são parâmetros empíricos. Para cada biótipo, ocorre um decréscimo generalizado em relação a fitomassa fresca relativa, comparativamente a respectiva testemunha, com o aumento da dose de glyphosate e com o decréscimo do estágio fenológico ($GR_{50}R/S = -0,0148Np^3 + 0,2986Np^2 - 1,7758Np + 3,439$; $R^2 = 1,0$). O modelo proposto: $Z = 100 - \{ 100 / [1 + [(ax)^b]^c] \}$, onde Z representa a porcentagem de controle na dose x do herbicida e a , b , c são parâmetros empíricos que proporcionam um ajuste biológico apropriado aos dados; apresentou o menor quadrado médio do resíduo, comparativamente aos outros modelos utilizados neste tipo de estudo. As informações geradas neste trabalho auxiliam na compreensão da característica da resistência e na interpretação dos efeitos desta nas estratégias de manejo.

Palavras-chave: Efeito fisiológico; Mecanismo de resistência; Modelagem; Planta daninha

ABSTRACT

Characterization of the glyphosate resistance in *Lolium multiflorum* (Lam.)

With the objective of characterizing the glyphosate resistance in *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) it was developed this research in order to: (a) test the effectiveness of the dose-response tests in Petri dishes and in whole-plant, of *in vivo* test of the shikimic acid accumulation and of net photosynthesis behavior test, as a methodology to detection glyphosate resistance in *Lolium* spp.; (b) characterize the resistance mechanisms in Italian ryegrass and; (c) modeling the relationship among the susceptible (S) and the resistant (R) biotypes to glyphosate, with two independent variables (doses of herbicide and plant growth stages) and performing a predictive model of the glyphosate resistance in Italian ryegrass. The evaluation of the detection tests allowed concluded that all tests were appropriate to identify the resistant biotypes. In the characterization of the resistance mechanisms, experiments were installed to analyze the pattern of shikimic acid accumulation, the behavior of physiological processes affected by glyphosate and the epicuticular waxes composition, as well as, characterize the foliar surface, the ^{14}C -glyphosate uptake and translocation. The conclusion were: the variables characterization of the uptake and epicuticular waxes quantification and chemical composition, didn't present distinction between R and S; though, the pattern of trichomes distribution on pairs in R biotype differs of the alone distribution in the case of S one, likewise, the glyphosate translocation was greater in direction to the areas that didn't receive the treatment with glyphosate in R biotype. The movement of glyphosate in the phloem follows the same pathway of the photosynthetic products being directly proportional to the transport of carbon fixed, as it was verified in R biotype that maintained the net photosynthesis constant during the experiment. The low levels of shikimic acid accumulation verified in R indicated that either glyphosate is not totally excluded from acting in EPSPs or that EPSPs can be partially inhibited by glyphosate, staying in the active form. Likewise, the glyphosate resistance in Italian ryegrass, probably, it is not attributed to a single resistance mechanism, as well as, the greater translocation of the herbicide in the R biotype probable represents the resistance mechanism. In the modeling studies, the non-linear model that provided a precise description of the relationship among the dependent variable and the independent variables was the following equation: $z = a / \{ [1 + [(x-b)/c]^2] \cdot [1 + [(y-d)/c]^2] \}$, where z represents the shoot biomass (%) at herbicide dose x ; y is the growth stage (number of tillers, Nt) and a , b , c and d are empiric parameters. For each biotype, there was a general decreasing in relative shoot biomass in comparison to its respective untreated controls as glyphosate dose increased and growth stage decreased ($GR_{50}R/S = -0.0148Nr^3 + 0.2986Nr^2 - 1.7758Nt + 3.439$; $R^2 = 1.0$). The proposed model: $Z = 100 - \{ 100 / [1 + [(ax)^b]^c] \}$, where Z represents the percentage of control at the herbicide dose x and a , b , c are empiric parameters that provide an appropriate biological fit to the data. It presented the smallest mean square error, comparatively to the other models used in this type of study. The information generated in this research help in the understanding of the resistance characteristic and in the interpretation of the effects of the management strategies.

Keywords: Physiological effect; Resistance mechanisms; Modeling; Weed

1 INTRODUÇÃO

Um dos herbicidas mais utilizados no controle de plantas daninhas, no Brasil e no mundo, é o glyphosate (N-fosfometil glicina) (MONQUERO, 2003). O herbicida glyphosate tem sido utilizado no meio agrícola por mais de trinta anos, sendo assim, devido à utilização intensiva deste herbicida as comunidades de plantas daninhas dos agroecossistemas criaram mecanismos de resposta ao distúrbio ambiental provocado pela pressão de seleção dos herbicidas através da mudança na flora específica (tolerância) ou seleção de certos biótipos resistentes nas populações de plantas daninhas (LÓPEZ-OVEJERO, 2006).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é caracterizada por uma redução na resposta de uma população a produtos químicos, aplicados nas doses recomendadas, porém, de forma repetitiva, causando pressão de seleção para o biótipo resistente, que normalmente encontra-se em baixa frequência (MONQUERO, 1999). Christoffoleti e López-Ovejero (2004) definiram resistência como sendo 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 (susceptíveis) da mesma espécie. Ao grupo de indivíduos possuidores de carga genética semelhante e pouco diferenciados da maioria dos indivíduos da espécie dá-se o nome de biótipo (KISSMANN, 1996). Desta forma, a resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um fenômeno natural que ocorre espontaneamente em suas populações, não sendo, portanto, o herbicida o agente causador e sim selecionador dos indivíduos resistentes que se encontravam em baixa frequência inicial (CHRISTOFFOLETI; VICTORIA FILHO; SILVA, 1994).

Os fatores mais importantes que influenciam a seleção de biótipos resistentes são a intensidade de uso, a eficiência e persistência do herbicida, a eficácia dos mecanismos de resistência, a especificidade do herbicida com respeito ao mecanismo de ação, o padrão de emergência da planta daninha e a eficiência dos métodos de controle alternativos aos métodos químicos (RUBIM, 1991).

Atualmente, casos de resistência envolvendo glyphosate foram relatados em doze espécies de plantas daninhas no mundo. O primeiro caso foi detectado em *Lolium rigidum* na Austrália (POWLES et al., 1998; PRATLEY et al., 1999), seguido por *Eleusine indica* na Malásia (TRAN; BAERSON; BRINKER, 1999; LEE; NGIM, 2000), *Conyza Canadensis* nos Estados Unidos (VanGESSEL, 2001; KOGER et al., 2004), *Lolium multiflorum* no Chile (PEREZ; KOGAN,

2003), *Conyza bonariensis* na África do Sul e Espanha (URBANO et al., 2005), *Ambrosia trifida* nos Estados Unidos (WEED SCIENCE, 2008), *Plantago lanceolata* na África do Sul (WEED SCIENCE, 2008), *Ambrosia artemisiifolia* nos Estados Unidos (SELLERS; POLLARDI; SMEDA, 2005), *Amaranthus palmeri* nos Estados Unidos, *Sorghum halepense* na Argentina, *Amaranthus rudis* nos Estados Unidos e *Echinochloa colona* na Austrália (WEED SCIENCE, 2008).

No Brasil, diversos casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas têm sido apontados em várias localidades, principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste; sendo relatadas 22 espécies em aproximadamente 100 áreas agrícolas. Para os inibidores da EPSPs destacam-se *Lolium multiflorum*, *Conyza bonariensis* e *C. canadensis*, relatados em 2003 e 2005, respectivamente, responsáveis por 12% das espécies resistentes relatadas no país (WEED SCIENCE, 2008). A planta daninha *L. multiflorum* (azevém) é uma gramínea de ciclo anual que se caracteriza como a planta daninha mais comum em lavoura com culturas de inverno na região Sul do Brasil, sendo tipicamente sensível ao herbicida glyphosate (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2004).

O glyphosate age inibindo a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (E.C. 2.5.1.19), que é responsável pela reação de conversão do shiquimato-3-fosfato (SHKP) e fosfoenolpiruvato (PEP) em 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi) na rota do ácido shiquímico e posteriormente catalisa a reação do corismato (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980; GRUYS et al., 1993; DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; GEIGER; FUCHS, 2002; MONQUERO, 2003). A inibição de EPSPs resulta no acúmulo de ácido shiquímico nas plantas e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), de vitaminas (K e E), das proteínas, dos alcalóides, da lignina, dos flavonóides, das coumarinas, do ácido indolacético (IAA), do teor de clorofila, dos carotenóides, dos benzoatos e dos quinatos; substâncias estas responsáveis pelo desenvolvimento das plantas (AMRHEIN et al., 1980; ANDERSON; JOHNSON, 1990; BENTLY, 1990; DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; ARNAUD et al., 1994; HERRMANN; WEAVER, 1999).

Em geral, a ação do herbicida pode ser compreendida como incluindo duas fases; a primeira fase envolve o movimento do herbicida ao local de ação, enquanto a segunda fase envolve as conseqüências metabólicas que são resultado da interação do herbicida com aquele sítio de ação. Na primeira fase, o herbicida entra nas células, difundi-se a curta distância (movimento célula a

célula), transporte à longa distância, conversão metabólica do herbicida (ativação ou desativação), e entrada nas organelas subcelulares. Na segunda fase, ocorre a interação do herbicida com o sítio de ação e, subseqüentemente, uma série de conseqüências fitotóxicas que resultam na morte da planta (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

A insensibilidade de plantas daninhas a princípios químicos pode ser causada por diferentes mecanismos, como: inibição na absorção e/ou translocação do herbicida nos biótipos, devido às diferenças físicas e/ou químicas; alteração no sítio de ação; metabolismo diferencial do herbicida na planta e/ou metabolização ou desintoxicação a substâncias menos fitotóxicas, maior atividade da enzima alvo; e compartimentalização ou seqüestro do herbicida (MATIELLO; RONZELLI; PURÍSSIMO, 1999; MONQUERO, 2003; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). A maioria dos casos relatados diz respeito à alteração no sítio de ação e aumento na degradação metabólica do herbicida pela planta daninha (ROMAN et al., 2004); no entanto estes estudos não têm priorizado os aspectos fisiológicos envolvido no mecanismo de resistência das plantas daninhas ao glyphosate. Geiger, Wen-Jang e Fuchs (1999) e Hetherington et al. (1999) sugeriram que a capacidade do glyphosate não se auto-inibir em *Beta vulgaris* e de *Zea mays*, geneticamente modificadas para conferir tolerância ao glyphosate, respectivamente, é o mecanismo de resistência que confere resistência a estas plantas. A ação fitotóxica da molécula glyphosate influencia a translocação dos fotoassimilados, acarretando na acumulação do shiquimato e no decréscimo da ribulose bisfosfato e do ácido fosfoglicérico (GEIGER; WEN-JANG; FUCHS, 1999).

O glyphosate é lentamente absorvido pela cutícula por meio do processo de difusão dos solutos. Fatores que influenciam neste processo incluem a temperatura, a formulação do herbicida, o gradiente de concentração, o tipo de cera epicuticular e a integridade, espessura e composição química da camada cuticular (ERICKSON; DUKE, 1981; MONQUERO, 2003).

A penetração do glyphosate nas células é mediada por proteínas transportadoras de fosfato, presentes no plasmalema (MERVOSH; BALKE, 1991). A translocação do glyphosate ocorre, preferencialmente, no floema, ou seja, segue simultaneamente a rota dos produtos da fotossíntese (açúcares), ocorrendo desde as folhas fotossinteticamente ativas (fonte) aos tecidos que utilizam estes fotoassimilados (drenos) para crescimento, manutenção e metabolismo, ou armazenamento para uso futuro, como, por exemplo, raízes, tubérculos, rizomas, folhas jovens e zonas meristemáticas (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; MONQUERO, 2003). A quantidade de

açúcar translocada para cada uma dessas partes muda durante o ciclo de vida da planta e, conseqüentemente, influencia o movimento do herbicida. Portanto, as condições que favoreçam a fotossíntese auxiliam também a translocação do glyphosate (DELLACIOPPA et al., 1986). A translocação representa um processo essencial para a eficácia do herbicida (WANAMARTA; PENNER, 1989). Da mesma forma, a absorção e o metabolismo também podem afetar a suscetibilidade de uma planta ao glyphosate.

A extensão de áreas agrícolas com presença de biótipos resistentes de *Lolium multiflorum* ao herbicida glyphosate tem aumentado em uma taxa elevada, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, nas áreas de cultivo com pomares de frutíferas e com cereais de inverno, sendo este último no sistema de plantio direto envolvendo a rotação de cultura, tornando-se cada vez mais freqüentes relatos de seleção de populações com predominância do biótipo resistente desta espécie a este herbicida (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2004; CHRISTOFFOLETI et al., 2004; TOCCHETTO et al., 2004; DORNELLES et al., 2004).

O inadequado planejamento das atividades agrícolas, em situações onde a resistência de plantas daninhas é constatada, traz como conseqüência o aumento de riscos quanto à possibilidade de insucesso no processo produtivo. A adoção de ferramentas adequadas para a tomada de decisões é o primeiro passo para se obter melhores resultados. Sendo assim, a modelagem é o instrumento que possibilita a compreensão da característica da resistência e conseqüentemente as medidas de manejo necessárias para tal situação (GARCÍA Y GARCÍA, 2002).

A utilização de herbicidas na agricultura, portanto, deve estar condicionada a embasamentos científicos para manejar os biótipos de plantas daninhas resistentes. Sabe-se que o manejo de plantas daninhas torna-se dificultado toda vez que a utilização de um herbicida ou um grupo de herbicidas de mesmo mecanismo de ação é limitado, condicionando assim o aparecimento de novos casos de resistência (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). Desta forma, é necessário que a resistência de plantas daninhas aos herbicidas seja compreendida de maneira aprofundada pelas pessoas envolvidas direta ou indiretamente com o manejo das plantas daninhas, visando à adoção de medidas adequadas e racionais de manejo dos biótipos de plantas daninhas resistentes, viabilizando a contínua exploração das áreas com esta problemática, de forma a maximizar a produtividade sem necessitar da expansão das fronteiras agrícolas.

Referências

- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.
- ANDERSON, K.S.; JOHNSON, K.A. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from from EPSPs synthase. **Chemical Review**, Boulder, v. 90, n. 7, p. 1131-1149, 1990.
- ARNAUD, L.; NURIT, F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Distribution glyphosate and its target enzyme inside wheat plants. **Pesticide Science**, London, v. 40, n.3, p. 217-223, 1994.
- BENTLY, R. The shikimate pathway metabolic tree with many branches. In: FASMAN, G.D. (Ed.). **Critical review in biochemistry and molecular biology**. Boca Raton: CRC Press, 1990. chap. 3, p. 307-384.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004. p. 3-22.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; TRENTIN, R.; MAROCHI, A.I.; GALLI, A.J.B.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Efeito do corte da parte aérea após aplicação de herbicidas no controle de biótipos resistentes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro. **Suplemento ...** São Pedro, 2004. p. 268.
- DELLACIOPPA, G.; BAUER, S.C.; KLEIN, B.K.; SHAH, D.M.; FRALEY, R.T.; KISHORE, G. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 83, p. 6973-6877, 1986.
- DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: PTR Prentice Hall, 1993. 441 p.
- DORNELLES, S.H.B.; HATSCHBACH, M.; BORTOLOTTTO, R.P.; DEBORTOLI, M.P. Avaliação de acessos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao glyphosate no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro. **Suplemento ...** São Pedro, 2004. p. 270.
- ERICKSON, C.G.; DUKE, W.B. The effect of glyphosate and surfactant concentration on subsequent penetration and translocation in quackgrass. **Proceedings of the Northeastern Weed Science Society**, v. 35, p. 33, 1981.

GARCÍA Y GARCÍA, A. **Modelos para área foliar, fitomassa e extração de nutrientes na cultura do arroz**. 2002. 90 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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. chap. 1, p. 59-85.

GEIGER, D.R.; WEN-JANG, S.; FUCHS, M.A. Causes of self-limited translocation of glyphosate in *Beta vulgaris* plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 124-133, 1999.

GRUYS, K.J.; MARZABADI, M.R.; PANSEGRAU, P.D.; SIKORSKI, J.A. Steady-state kinetic evaluations of the reverse reaction for *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 304, n. 2, p. 345-351, 1993.

HETHERINGTON, P.R.; REYNOLDS, T.L.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R.C. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 339, p. 1567-1576, 1999.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

KISSMANN, K.G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1996. 33 p.

KOGER, C.H.; POSTON, D.H.; HAYES, R.M.; MONTGOMERY, R.F. Glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. **Weed Technology**, Champaign, v. 18, n. 3, p. 820-825, 2004.

LEE, L.J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 4, p. 336-339, 2000.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F. **Resistência de populações da planta daninha *Digitaria ciliaris* (Retz.) Koel. a herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCCase)**. 2006. 101 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MATIELLO, R.R.; RONZELLI, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agrônômicos e genéticos. In: CURSO DE MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS AOS HERBICIDAS, 1999, Viçosa. Viçosa: UFV, 1999. p. 27-40.

MERVOSH, T.L.; BALKE, N.E. Effects of calcium, magnesium and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. **Weed Science**, Ithaca, v. 39, n. 3, p. 347-353, 1991.

MONQUERO, P.A. **Biologia, manejo e caracterização bioquímica e genética de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS)**. 1999. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

_____. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate**. 2003. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 12-19, 2003.

POWLES, S.B.; LORRAINE-COLWILL, D.F.; DELLOW, J.J.; PRESTON, C. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. **Weed Science**, Ithaca, v. 46, n. 5, p. 604-607, 1998.

PRATLEY, J.; URWIN, N.; STANTON, R.; BAINES, P.; BROSTER, J.; CULLIS, R.; SCHAFER, D.; BOHN, J.; KRUEGER, R. Resistance to glyphosate in annual ryegrass (*Lolium rigidum*): I Bioevaluation. **Weed Science**, Ithaca, v. 47, n. 4, p. 405-411, 1999.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 301-306, 2004.

RUBIM, B. Herbicide resistance in weeds and crops, progress and prospects. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. chap. 2, p. 387-414.

SELLERS, B.A.; POLLARDI, J.M.; SMEDA, R.J. Two common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) biotypes differ in biology and response to glyphosate. **Proceedings Weed Science Society**, Champaign, v. 45, p. 156, 2005.

STEINRÜCKEN, H.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 94, n. 4, p. 1207-1212, 1980.

TOCCHETTO, S.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MAROCHI, A.I.; GALLI, A.J.B.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência da planta daninha azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) ao herbicida glyphosate na região sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro. **Suplemento ...** São Pedro, 2004. p. 269.

TRAN, M.; BAERSON, S.R.; BRINKER, R. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. In: ASIAN-PACIFIC WEED SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 17., 1999, Bangkok. **Proceedings ...** Bangkok, 1999. p. 527-536.

URBANO, J.M.; BORREGO, A.; TORRES, V.; JIMENEZ, C.; LEON, J.M.; BARNES, J. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. **Proceedings Weed Science Society**, Champaign, v. 45, p. 394, 2005.

VanGESSEL, M.J. Glyphosate resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, Ithaca, v. 49, n. 6, p. 703-705, 2001.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate em pomares de maçã. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 617-622, 2004.

WANAMARTA, G.D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Science**, Ithaca, v. 24, p. 215-231, 1989.

WEED SCIENCE. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em: 29 jan. 2008.

2 TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Lolium* spp. RESISTENTES AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

Diagnosticar a presença de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas em uma população é o primeiro passo na escolha racional de práticas adequadas de manejo. Monitorar a natureza, a distribuição e a abundância das plantas resistentes nas áreas produtivas demanda testes efetivos de diagnóstico, no entanto não existem disponíveis na literatura informações sobre a comparação da efetividade de detecção dos diferentes métodos de diagnóstico; assim como sobre a praticidade, a viabilidade econômica e as técnicas para a execução em larga escala. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar a efetividade dos testes de dose-resposta, em placas de Petri e em vasos, de acumulação *in vivo* de ácido shiquímico e das taxas de fotossíntese líquida, como metodologia de detecção da resistência ao herbicida glyphosate. Os resultados obtidos no bioensaio em placas de Petri, sete dias após tratamento (DAT), indicaram que os biótipos resistentes ao glyphosate de *Lolium multiflorum* (VA e BR) e de *L. rigidum* (C) foram 27, 6 e 31 vezes mais resistentes ao glyphosate que os respectivos biótipos susceptíveis, *L. multiflorum* (SM e SBR) e *L. rigidum* (SR). No experimento realizado em vasos (21 DAT), os biótipos VA, BR e C foram 6, 3 e 12 vezes mais resistentes ao glyphosate que os respectivos biótipos susceptíveis. Os biótipos susceptíveis acumularam 3,2; 1,7 e 2,0 vezes mais ácido shiquímico nos tecidos foliares, 48 horas após tratamento (HAT), que os biótipos resistentes VA, BR e C, respectivamente. O herbicida glyphosate gradualmente inibiu a taxa de fotossíntese líquida em todas as plantas, todavia as 24-72 HAT os biótipos resistentes restabeleceram-se, enquanto nenhuma recuperação foi detectada nos biótipos susceptíveis. Todos os testes foram adequados para identificar os biótipos resistentes e, sendo assim, podem ser úteis aos produtores e profissionais da área agrícola, como uma ferramenta efetiva para reduzir a expansão das plantas daninhas resistentes e para adoção de práticas alternativas de manejo das plantas daninhas. Entretanto, estes testes diferem em relação ao tempo, aos custos e aos equipamentos necessários para condução dos mesmos. Os testes mais econômicos foram os bioensaios em placa de Petri e em vasos, porém são métodos demorados devido à necessidade, essencial, do emprego das sementes coletadas das plantas suspeitas. Os experimentos de quantificação de ácido shiquímico e de taxa fotossintética foram os mais rápidos, mas exigem equipamentos sofisticados que podem restringir seu uso.

Palavras-chave: Ácido shiquímico; Azevém perene; Azevém anual; Fotossíntese

EFFECT QUICK-TEST FOR DETECTION OF GLYPHOSATE-RESISTANT *Lolium* spp.

Abstract

Diagnosing herbicide-resistant weed biotypes is the first step for herbicide resistance management. Monitoring the nature, distribution, and abundance of the resistant plants in fields demands efficient and effective screening tests. Different glyphosate resistant biotypes of *Lolium multiflorum*, collected from Spain (VA) and from Brazil (BR), and *L. rigidum*, collected from Spain (C), were used in four rapid assays for testing their effectiveness to detect herbicide resistance. Petri dish and whole-plant dose-response bioassay, *in vivo* shikimic acid accumulation assay and gas exchange measurements, were used as the methods for detecting herbicide-resistant (HR) to glyphosate. According to a Petri dish bioassay 7 days after treatment (DAT), the VA, BR

and the C biotypes were 27, 6 and 31 times more resistant to glyphosate than the susceptible populations, *L. multiflorum* (SM – Spain – and SBR - Brazil) and *L. rigidum* (SR), respectively. On a whole-plant bioassay (21 DAT), the VA, BR and C biotypes were 6, 3 and 12 times more resistant to glyphosate than their respective susceptible populations. The susceptible populations accumulated 3.2, 1.7 and 2.0-fold more shikimic acid in leaf tissue, 48 hours after treatment (HAT), than the resistant VA, BR and C, respectively. Glyphosate gradually inhibited net photosynthesis in all plants but at 24-72 HAT the resistant plants recovered, whereas no recovery was detected in susceptible populations. All assays were capable of detecting the resistant biotypes and this may be useful for farmers and consultants as an effective tool to reduce the spread of the HR weeds to glyphosate. However, they differed in time, costs and equipments necessities for successfully caring on the tests. Regarding costs, the cheapest ones were Petri dishes and whole-plant bioassays, but they are time-consuming methods as the major constraints are the collection of seeds from the field. The shikimic acid and net photosynthesis assays were the quickest ones but they demand sophisticated equipments which could restrict its use.

Keywords: Annual ryegrass; Italian ryegrass; Photosynthesis; Shikimic acid

2.1 Introdução

O herbicida glyphosate, derivado de aminoácidos, têm como mecanismo de ação a inibição da síntese da 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP) (EC 2.5.1.19); resultando na deficiência da EPSP e dos produtos metabolizados na rota do ácido shiquímico, como os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, imprescindíveis à síntese de proteínas (SIEHL, 1997; HERRMANN; WEAVER, 1999; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). Entretanto, um efeito mais rápido e drástico que a redução potencial dos aminoácidos aromáticos, é a acumulação dos precursores da rota do corismato, notavelmente o shiquimato (AMRHEIN et al., 1980; LYDON; DUKE, 1988) e, com menor relevância, a acumulação de derivados do shiquimato como os ácidos benzóicos (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003). No processo da fotossíntese, o efeito inicial é o declínio imediato nos níveis da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), com conseqüente decréscimo nos níveis de outras substâncias químicas intermediárias à fixação do carbono. A perda destas substâncias intermediárias no ciclo fotossintético reutivo do carbono (ciclo de Calvin) é provavelmente devida, pelo menos em parte, ao movimento destas para dentro da rota do ácido shiquímico (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003).

O herbicida glyphosate apresenta uma estrutura química única (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003). Dentre as principais características que contribuem para o uso intensivo deste herbicida nas áreas agrícolas e não agrícolas, destacam-se o amplo espectro de controle das plantas daninhas anuais e perenes, a baixa toxicidade aos mamíferos e a reduzida atividade no solo (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003; POWLES; PRESTON, 2006). Após 30 anos de sua

disponibilização no mercado, o herbicida glyphosate é o defensivo agrícola de maior expressão mundial. Recentemente, após a introdução de culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glyphosate, bem como a expiração da patente da molécula, resultaram na redução dos custos das formulações comerciais e no expressivo incremento do emprego deste herbicida (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004; DUKE; CERDEIRA, 2005); o que pode contribuir significativamente para na seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas a este herbicida (MOREIRA et al., 2007).

O primeiro relato de planta daninha resistente ao glyphosate ocorreu na Austrália em populações de *Lolium rigidum* (PRATLEY et al., 1996), sendo posteriormente identificada em várias espécies de plantas daninhas e em outros países como África do Sul, Argentina, Brasil, Chile, China, Colômbia, Espanha, França, EUA e Malásia (WEED SCIENCE, 2008).

Atualmente, os principais métodos empregados no diagnóstico de evolução da resistência em plantas daninhas são os testes de dose-resposta em placas de Petri e em vasos (PEREZ-JONES et al., 2007). No entanto, estes testes apresentam alguns aspectos negativos, dentre eles: a necessidade do emprego de sementes das populações suspeitas e a influência na viabilidade das sementes (MONQUERO, 2003; STEADMAN, 2004; PEREZ-JONES et al., 2007). Estes dois fatores apresentam relações intrínsecas com o aumento do banco de sementes da área e o tempo decorrido para adoção de estratégias de manejo adequadas para tal situação (MONQUERO, 2003; PEREZ-JONES et al., 2007). Devido ao mecanismo de ação do herbicida glyphosate e, conseqüentemente, o acúmulo do shiquimato (AMRHEIN et al., 1980; LYDON; DUKE, 1988) e o efeito inibitório do processo fotossintético (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003), métodos alternativos de diagnóstico podem ser desenvolvidos.

Quando uma falha no controle de uma população de plantas daninhas por um herbicida é constatada, torna-se essencial o conhecimento da causa deste fenômeno, que pode ser decorrente da seleção de resistência ao herbicida na população (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). Portanto, o emprego de técnicas que identifiquem e caracterizem a resistência aos herbicidas, rapidamente, torna-se vital em tais situações. A rápida identificação permite que os produtores evitem a dispersão destes biótipos de plantas daninhas e apliquem medidas de controle efetivas e racionais e/ou a adoção de estratégias de manejo adequadas a tal situação (MONQUERO, 2003). Embora existam métodos de detecção da resistência descritos na literatura, a maioria deles não tem como objetivo a obtenção de uma resposta rápida de identificação e,

todavia, não foram comparados entre si com relação à precisão de determinação. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi determinar a efetividade de diferentes métodos na identificação de resistência ao glyphosate no gênero *Lolium*.

2.2 Material e métodos

De acordo com os procedimentos experimentais, os experimentos foram conduzidos em condição de câmara de crescimento, experimentos de dose-resposta em placas de Petri e em vasos, e de campo, experimentos para quantificação das variáveis fisiológicas acúmulo de ácido shiquímico e taxa de fotossíntese, do Departamento de Química Agrícola y Edafologia da Universidad de Córdoba – Espanha, entre Fevereiro e Junho de 2007. Os experimentos em campo foram instalados em área experimental da Diputación de Córdoba (37° 51' 42'' de latitude Norte, 04° 48' 00'' de longitude Oeste e 117 m de altitude). O solo foi classificado como franco-argiloso. O clima do local segundo a classificação de W. Köppen pertence ao tipo Csa. Durante o período de condução, a precipitação média mensal foi de 2,5 mm e a temperatura média de 15,3 °C (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2008).

Os experimentos foram conduzidos empregando-se biótipos resistentes ao glyphosate de *L. multiflorum*, coletados em olivares no município de Villanueva del Arzobispo - Espanha (VA) e em lavoura comercial (trigo-soja-milho) no município de Tapejara - Brasil (BR); e de *L. rigidum*, coletados em pomares de citros na província de Castellón - Espanha (C). Biótipos susceptíveis, coletados em áreas sem histórico de aplicação do herbicida glyphosate, de *L. multiflorum* (SM - Espanha e SBR - Brasil) e *L. rigidum* (SR - Espanha) foram incluídos. As localidades citadas, historicamente recebem duas aplicações de glyphosate, 720 g e.a. ha⁻¹ ao ano. As sementes foram coletadas e submetidas a um ciclo de estabilização, ou seja, as sementes, provenientes das plantas que sobreviveram à dose recomendada de glyphosate (720 g e.a. ha⁻¹), foram semeadas e as plantas mantidas em *bulk* (agrupadas), segundo metodologia proposta por VARGAS et al. (2004), até o final do ciclo de desenvolvimento, para a produção de sementes com o caráter resistência ao herbicida glyphosate (biótipo).

2.2.1 Testes com germinação em placa de Petri

O experimento foi desenvolvido, segundo metodologia proposta por Perez-Jones et al. (2007), utilizando-se placas de Petri com 0,09 m de diâmetro, contendo dois discos de papel filtro com 20 sementes em placa de Petri separadas por biótipo. Alíquotas de 5 mL de diferentes

concentrações de glyphosate (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, e 500 mg e.a. L⁻¹) foram adicionadas às placas e transferidas para uma câmara de crescimento com temperatura de 29/18°C dia/noite e 16 horas de fotoperíodo com a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida pelo equipamento Li-250A Light Meter[®] (Li-Cor Inc., EUA). O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento, sendo este proveniente da combinação fatorial entre os biótipos e as doses do herbicida. A variável resposta mensurada foi à redução do comprimento do coleóptilo em relação à testemunha, em dados percentuais, aos sete dias após tratamento (DAT). O comprimento do coleóptilo foi determinado desde o ponto de ruptura da cobertura seminal até a extremidade dos mesmos.

2.2.2 Curva de dose-resposta por meio do cultivo em vasos

Neste experimento, as parcelas experimentais constaram de vasos com capacidade de 500 mL preenchidos com uma mistura de areia:turfa na proporção volumétrica de 2:1, na densidade de quatro plantas por vaso. O experimento foi desenvolvido, segundo metodologia proposta por Perez-Jones et al. (2007), em câmara de crescimento com temperatura dia/noite de 29/18°C, 16 horas de fotoperíodo, 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA no nível da planta, e 80% de umidade relativa. Irrigando-se sempre que necessário. A aplicação do herbicida glyphosate (0, 0,036, 0,072, 0,144, 0,288, 0,576, 1,152, 2,304, 4,608, 9,000 kg e.a. ha⁻¹) foi realizada no estágio fenológico de três folhas completamente expandidas. As aplicações foram realizadas em câmara de aplicação equipada com bico tipo leque, modelo Teejet 80.02E, pressão de 200 kPa e distância de 0,50 m do alvo. Os tratamentos foram consequência da combinação fatorial entre os biótipos e as doses do glyphosate, sendo dispostos completamente ao acaso com seis repetições. Avaliou-se a fitomassa fresca aos 21 DAT, sendo esta normalizada para valores percentuais por meio da comparação da redução da fitomassa obtida nos tratamentos herbicidas com relação à testemunha.

2.2.3 Bioensaio de determinação *in vivo* de ácido shiquímico

O plantio dos biótipos foi realizado, no campo, em 01 de fevereiro de 2007. As parcelas foram constituídas de uma linha com 10 plantas por biótipo, espaçada de 1,0 m com 4,5 m de comprimento (4,5 m²). A adubação de plantio foi administrada com base na análise do solo e na recomendação para a cultura de *Lolium* spp., utilizando 150 kg ha⁻¹ da formulação NPK, 00-20-

20. O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso constituído por um tratamento (0,81 Kg e.a. glyphosate ha⁻¹) e três repetições. Durante o desenvolvimento do experimento o controle das plantas daninhas foi realizado por meio de capinas manuais. Irrigando-se sempre que necessário.

Quando as plantas se encontravam no estágio fenológico de perfilhamento, o glyphosate foi aplicado usando um pulverizador costal pressurizado com CO₂ calibrado para um volume de calda de 200 L ha⁻¹, equipado com uma ponta de pulverização do tipo leque (TJ 8100), a pressão constante de 2 bar.

As extrações do ácido shiquímico foram realizadas de acordo com Singh e Shaner (1998) com modificações feitas por Perez-Jones et al. (2007). O tecido foliar empregado na extração do ácido shiquímico proveio da sexta folha completamente expandida inserida no ramo central. Os tecidos foliares foram seccionados às 24, 48, 72 e 96 horas após tratamento (HAT), e 0,05 g de massa foliar, de cada biótipo, foi inserida em um recipiente contendo 1 mL de HCl (0,25 N). As amostras foram agitadas, congeladas a -20°C, descongeladas e submetidas ao banho-maria por 45 minutos a 37°C. Duas alíquotas de 25 µL, por amostra, foram misturadas com 100 µL de tampão de reação [ácido periódico 0,25% (p/v)/sódio meta-periodato 0,25% (p/v)] e submetidas ao banho-maria por 30 minutos a 37°C. Adicionou-se 100µL de tampão (0,6 N NaOH/0,22 M Na₂SO₃) a esta solução. O acúmulo de ácido shiquímico foi mensurado por meio de espectrofotômetro de massa (DU 640®, Beckman Coulter Inc, EUA) a uma densidade óptica de 380 nm (CROMARTIE; POLGE, 2000). A concentração de ácido shiquímico expressa em µg g⁻¹ de massa fresca foi determinada baseando-se em uma curva. A curva padrão foi determinada usando plantas não tratadas, para cada biótipo, e concentrações conhecidas de ácido shiquímico (Sigma-Aldrich, EUA).

Neste experimento optou-se pelo emprego da metodologia espectrofotométrica para determinação do acúmulo de ácido shiquímico, porque representa uma metodologia rápida e efetiva de quantificação (CROMARTIE; POLGE, 2000).

2.2.4 Determinação da taxa de fotossíntese líquida

Os biótipos de *Lolium* spp. receberam as mesmas condições de plantio, tratamento com glyphosate e crescimento das descritas no experimento de acúmulo *in vivo* de ácido shiquímico. O delineamento experimental adotado foi blocos ao acaso constituído por um tratamento (0,81 Kg

e.a. glyphosate ha^{-1}) e três repetições. A sexta folha completamente expandida, no ramo central, foi utilizada nas determinações das taxas de fotossíntese líquida por meio de um analisador de gases de infravermelho portátil (Li-Cor 6400[®], Li-Cor Inc., EUA). As avaliações foram realizadas ao meio dia, com exceção da avaliação às 4 HAT, sendo analisada uma folha por repetição. Cada planta foi mensurada 10 vezes em intervalos de cinco minutos entre cada medição, às 4, 24, 48, 72 e 96 HAT.

Durante as medições, a folha selecionada em cada planta foi colocada dentro da câmara selada do equipamento, não suprida por ar externo, sendo estabelecido $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA, $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$, 25°C , $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ fluxo de ar e umidade relativa de 50%. O aparelho Li-Cor 6400[®] foi calibrado todos os dias, de acordo com as recomendações do fabricante.

O aparelho Li-Cor 6400[®] estima a taxa de fotossíntese líquida pela mudança nas concentrações de CO_2 por unidade de tempo, segundo equação proposta por von Caemmerer e Farquhar (1981) (eq. 1):

$$A = \frac{F (C_a - C_r)}{100 S} - C_a E \quad (1)$$

Onde A é a taxa de assimilação líquida de CO_2 pela folha ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); F é a taxa de fluxo de ar ($\mu\text{mol s}^{-1}$); C_a e C_r são as concentrações de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mol ar}^{-1}$) da amostra e da referência; S é a área foliar (cm^2) e E é a taxa de respiração ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2.5 Análise estatística

Os resultados foram inicialmente submetidos à análise da variância com aplicação do teste F. Em seguida, para os experimentos de dose-resposta em placa de Petri e em vasos, aplicou-se o teste de Tukey (5% de probabilidade) sobre a decomposição fatorial, com o objetivo de comparar os biótipos de cada fator concentrações/doses do herbicida, e os dados provenientes dos tratamentos foram analisados conjuntamente, sendo ajustados ao modelo de regressão não-linear do tipo log-logístico proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) (eq. 2):

$$y = a + \frac{b - a}{1 + \left(\frac{x}{GR_{50}} \right)^c} \quad (2)$$

Em que y representa a redução do coleóptilo ou a redução da fitomassa fresca em relação à testemunha (%), na dose do herbicida x ; a é o limite inferior da curva, b é o limite superior da

curva, c é a declividade da curva no GR_{50} . GR_{50} representa a concentração (mg e.a. L^{-1}) ou a dose (kg e.a. ha^{-1}) do herbicida glyphosate que proporciona 50% de resposta da variável. O fator de resistência (FR) foi deduzido pela fórmula $GR_{50}(\text{resistente})/GR_{50}(\text{susceptível})$.

No experimento de assimilação de CO_2 , as curvas foram ajustadas pela regressão não-paramétrica do tipo “lowess” no decorrer do tempo. Para obtenção das médias e dos desvios padrões entre os tratamentos utilizou-se o procedimento MEANS do programa SAS® (versão 9.1, SAS Institute Inc, EUA).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Testes com germinação em placa de Petri

O teste F aplicado na análise da variância demonstrou a significância dos fatores biótipo e concentrações do herbicida, assim como a interação fatorial entre concentrações e biótipos, para a variável comprimento relativo do coleóptilo, entretanto a interação entre o biótipo *L. rigidum* e a concentração do herbicida não foi significativa ao nível de significância de 5% de probabilidade. O teste da soma dos quadrados do resíduo indicou que o modelo representa, ao nível de 0,01% de significância, a relação entre a redução do comprimento do coleóptilo nos biótipos em relação às concentrações do herbicida glyphosate. O modelo apresentou adequado ajuste entre os valores observados e estimados, apresentando coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,71 (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Parâmetros do modelo de regressão não-linear log-logístico¹ com seus respectivos desvios padrões, coeficiente de determinação (R^2), redução de 50% de desenvolvimento (GR_{50}) e fator de resistência (FR) obtidos no teste de dose-resposta em placa de Petri

Biótipos	Parâmetros					
	a	b	c	R^2	GR_{50} (mg e.a. L^{-1})	FR
VA	0,00 (48,48)	89,23* (3,17)	1,69 (0,87)	0,71	183,41 (133,00)	27,46
SM	4,83* (1,22)	90,46* (1,41)	1,12* (0,09)	0,98	6,68* (0,37)	
BR	13,19 (12,94)	98,36* (5,12)	1,31* (0,45)	0,94	55,12* (17,77)	6,09
SBR	0,17 (2,90)	100,06* (3,93)	1,37* (0,21)	0,98	9,05* (0,99)	
C	42,77* (2,78)	93,22* (1,21)	9,59 (20,51)	0,89	115,90* (37,65)	31,41
SR	0,00 (3,97)	99,90* (2,14)	0,67* (0,13)	0,96	3,69* (0,51)	

¹ y [redução do comprimento do coleóptilo relativo à testemunha (%)] = $a + \{(b - a)/[1 + (x/GR_{50})^c]\}$. * Significativo ao teste t-Student, a 5% de probabilidade. VA e BR, biótipos de *Lolium multiflorum* resistentes ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; SM e SBR, biótipos de *L. multiflorum* susceptíveis ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; C e SR, biótipos de *L. rigidum* resistente e susceptível ao glyphosate, respectivamente, provenientes da Espanha.

Em todos os biótipos estudados, observou-se decréscimo no comprimento do coleóptilo com relação à respectiva testemunha, com o aumento nas concentrações de glyphosate (Figura 2.1). Entretanto, o comportamento da curva de dose-resposta observada nos biótipos resistentes foi diferente do observado nos biótipos susceptíveis (Figura 2.1). Desta forma, observou-se os valores do fator de resistência de 27, 6 e 31, nos biótipos VA, BR e C, respectivamente (Tabela 2.1). O fator de resistência expressa o número de vezes em que a concentração necessária para controlar 50% do biótipo resistente é superior à concentração que controla 50% do respectivo biótipo susceptível (CARVALHO et al., 2005).

Figura 2.1 - Valores percentuais do comprimento do coleóptilo relativo à testemunha (CCr) em função da dose de glyphosate (D , mg e.a L^{-1}), aos 7 DAT, nos biótipos de *Lolium multiflorum* (A) e de *L. rigidum* (B). VA e BR, biótipos de *L. multiflorum* resistentes ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; SM e SBR, biótipos de *L. multiflorum* susceptíveis ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; C e SR, biótipos de *L. rigidum* resistente e susceptível ao glyphosate, respectivamente, provenientes da Espanha. Símbolos e linhas representam os valores obtidos e estimados segundo modelo proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995). Barras verticais representam $\pm$ desvio padrão da média. $DMS_{(VA-SM)} = 4,92$, $DMS_{(BR-SBR)} = 6,23$ e $DMS_{(C-SR)} = 9,88$

A metodologia de identificação de biótipos de *Lolium* spp. resistentes ao glyphosate por meio da utilização da técnica de curvas de dose-resposta em placas de Petri é simples, sem demandar o uso de equipamentos sofisticados e caros. Sendo relatada por diversos pesquisadores como viável de identificação de populações resistentes aos herbicidas (HEAP; KNIGHT, 1986; BECKIE et al., 1990; MURRAY et al., 1996; O'DONOVAN; RASHID; NGUYEN, 1996; KOTOULA-SYKA; TAL; RUBIN, 2000; TAL; KOTOULA-SYKA; RUBIN, 2000;

CHRISTOFFOLETI, 2002; PEREZ; KOGAN, 2003; NEVE; SADLER; POWLES, 2004; CARVALHO et al., 2005; PEREZ-JONES et al., 2007). Esta metodologia apresentou diversas vantagens, porém existem aspectos negativos de seu uso, como a influencia da temperatura, da RFA, da hidratação das sementes, das condições de armazenamento e da própria viabilidade da semente, no processo germinativo destas, e desta forma, dificultando a viabilização do emprego desta tecnologia, principalmente em larga escala.

2.3.2 Curva de dose-resposta por meio do cultivo em vasos

O teste F resultante da análise da variância demonstrou a significância dos fatores estudados (biótipo e dose) e da interação fatorial entre os mesmos com relação a variável fitomassa fresca relativa à testemunha. O teste da soma dos quadrados do resíduo indicou que o modelo representa, ao nível de significância de 0,01%, a relação entre a redução da fitomassa fresca nos biótipos e as doses do glyphosate. O modelo apresentou ajuste adequado entre os valores observados e estimados, correspondente aos coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,78 (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Parâmetros do modelo de regressão não-linear log-logístico¹ com seus respectivos desvios padrões, coeficiente de determinação (R^2), redução de 50% de desenvolvimento (GR_{50}) e fator de resistência (FR), obtidos no teste de dose-resposta em vasos

Biótipos	Parâmetros					
	a	B	c	R^2	GR_{50} (kg e.a. L ⁻¹)	FR
VA	8,54* (3,31)	79,42* (3,06)	2,38* (0,61)	0,86	0,48* (0,06)	6,00
SM	9,39* (1,50)	96,40* (3,16)	2,34* (0,31)	0,94	0,08* (0,01)	
BR	0,00 (3,39)	86,33* (3,10)	1,25* (0,18)	0,93	0,37* (0,05)	
SBR	0,00 (2,47)	96,77* (3,63)	1,19* (0,14)	0,94	0,12* (0,01)	
C	0,00 (11,07)	86,14* (5,77)	0,92* (0,28)	0,78	0,59* (0,23)	11,80
SR	1,77 (2,40)	87,99* (3,91)	1,10* (0,19)	0,89	0,05* (0,01)	

¹ y [redução da fitomassa fresca relativa à testemunha (%)] = $a + \{(b - a)/[1 + (x/GR_{50})^c]\}$. * Significativo ao teste t-Student, a 5% de probabilidade. VA e BR, biótipos de *Lolium multiflorum* resistentes ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; SM e SBR, biótipos de *L. multiflorum* susceptíveis ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; C e SR, biótipos de *L. rigidum* resistente e susceptível ao glyphosate, respectivamente, provenientes da Espanha.

A resposta dos biótipos de *L. multiflorum* e de *L. rigidum* às doses crescentes de glyphosate está apresentada na Figura 2.2, sendo observado decréscimo generalizado com relação ao aumento das doses. Desta forma, observou-se os valores do fator de resistência de 6, 3 e 11, nos biótipos VA, BR e C, respectivamente (Tabela 2.2), representando o número de vezes em que

a dose necessária para controlar 50% do biótipo resistente é superior à concentração que controla 50% do respectivo biótipo susceptível (CARVALHO et al., 2005).

Figura 2.2 - Valores percentuais de controle, fitomassa fresca relativa à testemunha (*FFr*) em função da dose de glyphosate (*D*, mg e.a L⁻¹), aos 21 DAT, nos biótipos de *Lolium multiflorum* (A) e de *L. rigidum* (B). VA e BR, biótipos de *L. multiflorum* resistentes ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; SM e SBR, biótipos de *L. multiflorum* susceptíveis ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; C e SR, biótipos de *L. rigidum* resistente e susceptível ao glyphosate, respectivamente, provenientes da Espanha. Símbolos e linhas representam os valores obtidos e estimados segundo modelo proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995). Barras verticais representam $\pm$ desvio padrão da média. $DMS_{(VA-SM)} = 3,88$, $DMS_{(BR-SBR)} = 2,92$ e $DMS_{(C-SR)} = 4,64$

Os fatores de resistência observados no teste de dose-resposta em vasos foram menores que os observados no teste em placa de Petri. Este comportamento foi observado por Perez e Kogan (2003) ao realizarem experimentos de dose-resposta em placa de Petri e em vasos para confirmar a evolução da resistência ao glyphosate em populações de *L. multiflorum* em pomares do Chile.

Constatou-se que o teste de dose-resposta em vaso foi uma técnica efetiva para identificar a característica de resistência ao herbicida glyphosate, assim como para determinar o fator de resistência ao herbicida. Entretanto, esta técnica demanda mais tempo e espaço, além de apresentar um custo mais elevado em relação ao teste em placa de Petri. Todavia apresenta a vantagem da obtenção dos valores do fator de resistência mais realísticos, visto que as doses empregadas e o estágio fenológico da planta daninha no momento da aplicação representam,

comparativamente, as condições de campo onde estes biótipos desenvolveram a resistência ao herbicida glyphosate.

2.3.3 Bioensaio de determinação *in vivo* de ácido shiquímico

Quando plantas foram tratadas com glyphosate acumularam maior quantidade de ácido shiquímico nos tecidos foliares dos biótipos susceptíveis de *Lolium* spp., comparativamente aos biótipos resistentes ao herbicida glyphosate VA, BR e C (Tabela 2.3). As 24 HAT todos os biótipos acumularam ácido shiquímico igualmente (Tabela 2.3). O acúmulo de ácido diferenciou-se efetivamente entre os biótipos resistentes e susceptíveis a partir das 48 HAT. Entretanto, os biótipos resistentes apresentaram baixa susceptibilidade ao acúmulo de ácido shiquímico desde 24 HAT até 72 HAT (Tabela 2.3). Os biótipos susceptíveis acumularam 3,2, 1,7 e 2,0 vezes mais ácido shiquímico que os biótipos resistentes VA, BR e C, respectivamente, as 48 HAT. A diferença no acúmulo de ácido shiquímico entre os biótipos resistentes e susceptíveis foi observada até a última análise efetuada (Tabela 2.3.).

Tabela 2.3 - Acúmulo de ácido shiquímico (mg g massa fresca⁻¹) no período após aplicação do tratamento (HAT) com o herbicida glyphosate (0,81 kg e.a. ha⁻¹) nos biótipos de *Lolium multiflorum* e de *L. rigidum*

Biótipo	Horas após tratamento (HAT)		
	24	48	72
VA	1,15 A a	1,23 B a	1,18 B a
SM	1,17 A c	3,98 A b	7,89 A a
CV(%) = 5,96	F _(biótipo x tempo) = 416,37*	DMS _(linha) = 0,23	DMS _(coluna) = 0,36
BR	1,15 A b	2,32 B a	2,38 B a
SBR	1,25 A c	4,12 A b	8,39 A a
CV(%) = 4,44	F _(biótipo x tempo) = 441,00*	DMS _(linha) = 0,20	DMS _(coluna) = 0,31
C	1,43 A a	1,08 B b	1,50 B a
SR	0,88 B c	2,20 A b	6,67 A a
CV(%) = 8,79	F _(biótipo x tempo) = 213,46*	DMS _(linha) = 0,28	DMS _(coluna) = 0,44

* Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou minúsculas iguais na linha, não diferem entre si ao teste Tukey, com 5% de significância. VA e BR, biótipos de *L. multiflorum* resistentes ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; SM e SBR, biótipos de *L. multiflorum* susceptíveis ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; C e SR, biótipos de *L. rigidum* resistente e susceptível ao glyphosate, respectivamente, provenientes da Espanha.

O herbicida glyphosate tem como mecanismo de ação a inibição da enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintetase (EPSPs) e, desta forma, paralisação da rota do ácido shiquímico (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980; SCHÖNBRUNN et al., 2001; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). Como consequência direta ocorre a elevação dos níveis de ácido

shiquímico nas plantas (SINGH; SHANER, 1998). Sendo assim, a metodologia de estudo do acúmulo de ácido shiquímico nos tecidos foliares das plantas representa uma técnica rápida, altamente confiável e extremamente útil para a detecção do efeito do herbicida glyphosate nas plantas. O acúmulo de ácido shiquímico nos tecidos foliares após o tratamento com glyphosate também foi observado por outros autores como Tran et al. (1999), Baerson et al. (2002), Muller et al. (2003), Simarmata, Kaufmann e Penner (2003), Vidal, Lamego e Trezzi (2006), Wakelin e Preston (2006) e Perez-Jones et al. (2007).

O baixo nível de acúmulo de ácido shiquímico nos biótipos resistentes ao glyphosate indica que o mesmo não foi totalmente inibido de atuar em seu sítio de ação (EPSPs) ou que a síntese da EPSP pode ser parcialmente inibida pelo glyphosate. Desta forma, esta metodologia efetivamente pode ser empregada para confirmar a presença de biótipos resistentes ao herbicida glyphosate.

2.3.4 Determinação da taxa de fotossíntese líquida

O herbicida glyphosate promoveu a inibição gradual na fotossíntese líquida desde a primeira avaliação nos biótipos susceptíveis. As populações SM, SBR e SR apresentaram decréscimo às 4 HAT e continuaram decrescendo gradualmente durante todo o experimento até às 96 HAT, mostrando que a fotossíntese líquida gradualmente decresceu dia a dia, com tendência a zero (Tabela 2.4). Em contraste, os biótipos resistentes estabilizaram a taxa fotossintética as 24 HAT, sendo que nas avaliações seguintes (48, 72 e 96 HAT) houve um acréscimo gradual (Tabela 2.4). Esse comportamento refletiu a capacidade de retomada da taxa de fotossíntese líquida pelos biótipos resistentes, enquanto nenhuma recuperação foi observada nos biótipos susceptíveis (Tabela 2.4). Os biótipos resistentes de *L. multiflorum*, VA e BR, e de *L. rigidum*, C, produziram duas vezes mais fotossíntese líquida que as populações susceptíveis as 24, 48 e 72 HAT, respectivamente (Tabela 2.4).

Nas plantas, o glyphosate atua como inibidor da atividade de EPSPs, a qual influencia uma série de reações que implicam no estímulo à produção de etileno e aumento nos teores de ácido indolacético, assim como, redução da síntese de proteínas e inibição da síntese de clorofila (HERRMANN; WEAVER, 1999). Em algumas espécies o aumento de ácido shiquímico pode inibir a fotossíntese horas após a aplicação do glyphosate (SERVAITES; TUCCI; GEIGER, 1987). O maior acúmulo de ácido shiquímico e, conseqüentemente, a inibição do processo

fotossintético foi observado nos biótipos susceptíveis. O mesmo comportamento foi observado por Ribeiro et al. (2007), em estudos do efeito do glyphosate em diferentes biótipos de *L. multiflorum* resistente ao herbicida glyphosate, provenientes da região Sul do Brasil.

Tabela 2.4 - Taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) no período após aplicação do tratamento (HAT) com o herbicida glyphosate ($0,81 \text{ kg e.a. ha}^{-1}$) nos biótipos de *Lolium multiflorum* e de *L. rigidum*

Biótipo	Horas após tratamento (HAT)					
	0	4	24	48	72	96
VA	8,09 B c	6,31 B d	6,57 A d	6,18 A d	13,10 A b	19,66 A a
SM	12,54 A a	11,24 A b	4,62 A d	2,61 B e	2,28 B e	6,80 B c
CV(%) = 19,53		$F_{(\text{biótipo} \times \text{tempo})} = 31,45^*$		$\text{DMS}_{(\text{linha})} = 1,12$		$\text{DMS}_{(\text{coluna})} = 2,91$
BR	6,20 B c	6,32 B c	7,81 A b	7,98 A b	10,82 A a	11,10 A a
SBR	11,87 A a	11,24 A a	3,62 B b	2,27 B c	1,94 B c	0,47 B d
CV(%) = 27,32		$F_{(\text{biótipo} \times \text{tempo})} = 20,77^*$		$\text{DMS}_{(\text{linha})} = 1,28$		$\text{DMS}_{(\text{coluna})} = 3,32$
C	10,82 A c	8,29 A d	2,75 B f	5,98 A e	12,96 A b	19,67 A a
SR	12,32 A a	10,87 A b	5,47 A d	6,59 A c	5,94 B cd	4,34 B e
CV(%) = 16,88		$F_{(\text{biótipo} \times \text{tempo})} = 35,61^*$		$\text{DMS}_{(\text{linha})} = 1,03$		$\text{DMS}_{(\text{coluna})} = 2,66$

* Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou minúsculas iguais na linha, não diferem entre si ao teste Tukey, com 5% de significância. VA e BR, biótipos de *L. multiflorum* resistentes ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; SM e SBR, biótipos de *L. multiflorum* susceptíveis ao glyphosate provenientes da Espanha e do Brasil, respectivamente; C e SR, biótipos de *L. rigidum* resistente e susceptível ao glyphosate, respectivamente, provenientes da Espanha.

Shaner e Lyon (1979) observaram o efeito do glyphosate na redução da fotossíntese líquida em *Phaseolus vulgaris* às 4 horas após a aplicação do herbicida. Zapparoli et al. (2007) e Cardoso et al. (2007) observaram a redução nas taxas de fotossíntese líquida aos 11 dias após aplicação de glyphosate nas espécies *Commelina diffusa* e *C. erecta*, respectivamente; entretanto Soares Filho et al. (2007) observaram redução da taxa de fotossíntese às 48 horas após a aplicação de glyphosate na espécie *C. benghalensis*. Neste estudo não foi observada diferença, de tal magnitude, entre as duas espécies estudadas do gênero *Lolium*, possibilitando a viabilidade da utilização desta técnica para as mesmas.

Desta forma, esta metodologia efetivamente pode ser empregada para confirmar a seleção de biótipos resistentes ao herbicida glyphosate, como possibilita o esclarecimento sobre os parâmetros fisiológicos aos quais a aplicação do glyphosate esta envolvida, ou seja, para o gênero *Lolium* spp. o glyphosate apresenta um efeito inicial direto no processo carboxilativo fotossintético.

2.3.5 Comparação entre os testes

Tanto o teste de dose-resposta em placas de Petri quanto o teste de dose-resposta em vasos diferenciaram os biótipos resistentes de *L. multiflorum* e de *L. rigidum* dos respectivos biótipos susceptíveis ao glyphosate. O teste de dose-resposta em placas de Petri é um método simples, rápido e de baixo custo; que já foi empregado por diversos autores para qualificar a resistência aos herbicidas (PEREZ; KOGAN, 2003; NEVE; SADLER; POWLES, 2004; PEREZ-JONES et al., 2007). Todavia, o teste de dose-resposta em vasos diretamente quantifica a resistência ao herbicida, visto que simula a situação de campo na qual os biótipos desenvolveram a resistência ao glyphosate; porém foi um método mais demorado, com maior demanda por espaço na condução do experimento e de maior custo que o teste em placas de Petri, principalmente quando muitos biótipos devem ser avaliados (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Metodologias, matérias prima, equipamentos, locais, demanda de tempo e custos para execução dos testes de identificação da característica de resistência ao glyphosate no gênero *Lolium*

Metodologias	Matéria prima	Equipamentos	Locais	Tempo (DAT ou HAT/Total) ¹	Custo relativo ²
Placa de Petri	sementes	placa de Petri	condições controladas ³	7 DAT/150 DAT	baixo
Vasos	plântulas	vasos	casa-de-vegetação ⁴	21 DAT/200 DAT	médio
Ácido shiquímico	plântulas até inflorescência	reagentes e espectrofotômetro	campo e laboratório	48 HAT /X ⁵	alto
Fotossíntese	plântulas até inflorescência	medidor de trocas gasosas	campo	> 24 HAT /X ⁵	alto

¹ DAT – Dias após tratamento, HAT – Horas após tratamento, Total – Tempo requerido para condução de todo o experimento (ciclo de desenvolvimento das plantas + avaliações); ² Custos para realização de um experimento; ³ Recomenda-se realizar este experimento sobre condições controladas para evitar interferências devido ao processo germinativo; ⁴ Pode ser desenvolvido em câmara de crescimento; ⁵ Dependente do estágio fenológico da planta escolhido para realizar as medições (plântulas até inflorescência).

Uma das desvantagens dos testes de dose-resposta, em placas de Petri e em vasos, é que impossibilitam a determinação da presença de biótipos resistentes de plantas daninhas durante o ano agrícola (safra), onde normalmente ocorrem falhas do controle do herbicida e, todavia as sementes destas plantas daninhas não estão disponíveis. A partir desses fatos, surgiu a necessidade de metodologias rápidas e precisas, capazes de detectar biótipos resistentes de plantas daninhas durante a safra das culturas.

A essencialidade do emprego das sementes, produzidas pelas plantas suspeitas de apresentarem resistência aos herbicidas, para o desenvolvimento dos testes em placa de Petri e em

vasos implica em três principais desvantagens: o tempo transcorrido para finalização do ciclo de desenvolvimento da planta daninha (coleta das sementes), implícita a esta, o aumento do banco de sementes da área agrícola com sementes provenientes das plantas daninhas suspeitas e, não permite que medidas de manejo sejam adotadas em uma área antes da interferência destes biótipos com a cultura.

Os métodos de acúmulo de ácido shiquímico e da taxa de assimilação líquida de CO₂ possibilitam a realização dos testes logo após a constatação da falha de controle pelo herbicida no campo. As exigências para aplicação destas metodologias variam, isto é, o experimento de ácido shiquímico utiliza pedaços de folhas das plantas suspeitadas como matéria prima para realizar as análises; enquanto o experimento de taxa de fotossíntese líquida mensura as trocas gasosas que ocorrem nas folhas, representando um método não destrutivo. Estes testes podem ser realizados imediatamente após a confirmação de falhas de controle e demanda menos espaço que o teste de dose-resposta em vasos, porém exigem equipamentos sofisticados que podem restringir seu uso (Tabela 2.5). O custo inicial destes equipamentos sofre uma amortização (depreciação) em um curto prazo de tempo, quando muitos biótipos de plantas daninhas necessitam ser testadas. Estes testes são úteis aos produtores e profissionais da área agrícola como ferramenta efetiva para reduzir a expansão das plantas daninhas resistentes, devido à viabilização de implementações das práticas alternativas de manejo das plantas daninhas.

2.4 Conclusões

Os testes de dose-resposta em placas de Petri e em vasos, de acúmulo de ácido shiquímico e de taxa de assimilação líquida de CO₂ identificam efetivamente os biótipos de *L. multiflorum* e de *L. rigidum* resistentes ao herbicida glyphosate, sendo, portanto, confiáveis na detecção de biótipos de *Lolium* spp. resistentes a este herbicida.

Os testes de acúmulo de ácido shiquímico e de taxa de assimilação líquida de CO₂ são mais rápidos, passíveis de condução em tecidos vegetais (fases iniciais da planta), porém apresentam maior custo relativo.

Referências

- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRÜCKEN, 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**, Rockville, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.
- BAERSON, S.R.; RODRIGUEZ, D.J.; BIEST, N.A.; TRAN, M.; YOU, J.; KREUGER, R.W.; DILL, G.M.; PRATLEY, J.E.; GRUYS, K.J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Ithaca, v. 50, n. 6, p. 721-730, 2002.
- BECKIE, H.J.; FRIESEN, L.F.; NAWOLSKY, K.M.; MORRISON, I.N. A rapid bioassay to detect trifluralin-resistant green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Technology**, Champaign, v. 4, n. 3, p. 505-508, 1990.
- CAEMMERER, S. von; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, Berlin, v. 153, n. 4, p. 376-387, 1981.
- CARDOSO, L.A.; SOARES FILHO, S.I.B.; ZAPPAROLI, R.A.; SOUZA, A.V.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J.D. Eficiência de controle e respostas das trocas gasosas na espécie *Commelina erecta* sob diferentes doses de glyphosate. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos ...** Botucatu: FCA, 2007. 1 CD-ROM.
- CARVALHO, S.J.P.; LOMBARDI, B.P.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n.3, p.535-542, 2005.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2.Ee. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004. p. 39-40.
- CROMARTIE, T.H.; POLGE, N.D. An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. **Proceeding Weed Science Society**, Champaign, v. 40, p. 291, 2000.
- DUKE, S.O.; CERDEIRA, A. **International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)**. Trieste: Padriciano, 2005. p. 66-143. Disponível em: <<http://www.icgeb.org/biosafety/publications.htm>>. Acesso em: 17 fevereiro 2008.
- DUKE, S.O.; BAERSON, S.R.; RIMANDO, A.M. **Glyphosate**. New York: Wiley. 2003. 120 p.

HEAP, I.; KNIGHT, R. The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 37, n. 2, p. 149-156, 1986.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

INSTITUTO ANDALUZ DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA. **Estaciones agroclimáticas de la ciudad de Córdoba**. Disponível em: <<http://www.juntadeandalucia.es/innovacioncienciayempresa/ifapa/ria/servlet/FrontController?action=Static&url=datosHistoricos.jsp>>. Acesso em: 09 jan. 2008.

KOTOULA-SYKA, E.; TAL, A.; RUBIN, B. Diclofop-resistant *Lolium rigidum* from northern Greece with cross-resistance to ACCase inhibitors and multiple resistance to chlorsulfuron. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 12, p. 1054-1058, 2000.

LYDON, J.; DUKE, S.O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 36, n. 4, p. 813-818, 1988.

MONQUERO, P.A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate**. 2003. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

MUELLER, T.C.; MASSEY, J.H.; HAYES, R.M.; MAIN, C.L.; STEWART JUNIOR, N. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 3, p. 680-684, 2003.

MURRAY, B.G.; FRIESEN, L.F.; BEAULIEU, K.J.; MORRISON, I.N. A seed bioassay to identify acetyl-CoA carboxylase inhibitor resistant wild oat (*Avena fatua*) populations. **Weed Technology**, Champaign, v. 10, p. 85-89, 1996.

NEVE, P.; SADLER, J.; POWLES, S.B. Multiple herbicide resistance in a glyphosate-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) population. **Weed Science**, Ithaca, v. 52, n. 6, p. 920-928, 2004.

O'DONOVAN, J.T.; RASHID, A.; NGUYEN, H.V. A seedling bioassay for assessing the response of wild oat (*Avena fatua*) populations to triallate. **Weed Technology**, Champaign, v. 10, n. x, p. 931-935, 1996.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 12-19, 2003.

- PEREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 2, p. 395-404, 2007.
- POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, Champaign, v. 20, n. 2, p. 282-289, 2006.
- PRATLEY, J.; BAINES, P.; EBERBACH, P.; INCERTI, M.; BROSTER, J. Glyphosate resistance in annual ryegrass. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE GRASSLAND SOCIETY OF NEW SOUTH WALES, 11., 1996, Wagga Wagga. **Proceedings ...** Wagga Wagga, 1996. p. 126.
- RIBEIRO, D.N.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRADO, R.; VARGAS, L.; VIVIAN, R.; MARTINS, B.A.B. Photosynthesis and respiration rate of *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) biotypes resistant to glyphosate. In: NATIONAL MEETING AND EXPOSITION OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 233., 2007, Chicago. **Proceedings ...** Chicago, 2007. p. 11.
- SCHÖNBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W.A.; SCHLOSS, J.V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J.N.S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Oxford, v. 98, p. 1376–1380, 2001.
- SEEFELDT, S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, Champaign, v. 9, p. 218-225, 1995.
- SERVAITES, J.C.; TUCCI, M.A.; GEIGER, D.R. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 370-374, 1987.
- SHANER, D.L.; LYON, J.L. Stomatal cycling in *Phaseolus vulgaris* L. in response to glyphosate. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p.83-87, 1979.
- SIEHL, D.L. Inhibitors of EPSPS synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. In: ROE, R.M.; BURTON, J.D.; KUHR, R.J. (Ed.). **Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: IOS Press, 1997. p. 37-67.
- SIMARMATA, M.; KAUFMANN, J.E.; PENNER, D. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Ithaca, v. 51, n. 5, p. 678–682, 2003.
- SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, p. 527-530, 1998.
- SOARES FILHO, S.I.B.; ZAPPAROLI, R.A.; CARDOSO, L.A.; SOUZA, A.V.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J.D. Influência de diferentes doses de glyphosate na eficiência de controle e na resposta das trocas gasosas em *Commelina benghalensis* L. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL

SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos ...** Botucatu: FCA, 2007. 1 CD-ROM.

STEADMAN, K.J. Dormancy release during hydrated storage in *Lolium rigidum* seeds is dependent on temperature, light quality, and hydration status. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 929-937, 2004.

STEINRÜCKEN, H.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 94, n. 4, p. 1207-1212, 1980.

TAL, A.; KOTOULA-SYKA, E.; RUBIN, B. Seed-bioassay to detect grass weeds resistant to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 467-472, 2000.

TRAN, M.; BAERSON, S.; BRINKER, R.; CASAGRANDE, L.; FALETTI, M.; FENG, Y.; NEMETH, M.; REYNOLDS, T.; RODRIGUEZ, D.; SHAFFER, D.; STALKER, D.; TAYLOR, N.; TENG, Y.; DILL, G. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. In: ASIAN-PACIFIC WEED SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 17., 1999, Bangkok. **Proceedings ...** Bangkok: The Asian-Pacific Weed Science Society, 1999. p. 527-536.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate em pomares de maçã. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 617-622, 2004.

VIDAL, R.A.; LAMEGO, F.P.; TREZZI, M.M. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, p. 597-604, 2006.

WAKELIN, A.M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 432-440, 2006.

WEED SCIENCE. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em: 29 jan. 2008.

ZAPPAROLI, R.A.; SOARES FILHO, S.I.B.; CARDOSO, L.A.; SOUZA, A.V.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J.D. Respostas das trocas gasosas e eficiência no controle de *Commelina diffusa* sob diferentes doses de glyphosate. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos ...** Botucatu: FCA, 2007. 1 CD-ROM.

3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLYPHOSATE EM *Lolium multiflorum*

Resumo

O uso contínuo de herbicidas pertencentes a um único mecanismo de ação resulta em pressão de seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas. Um biótipo de *Lolium multiflorum* resistente ao herbicida glyphosate foi selecionado após aplicações sucessivas deste produto, apresentando um fator de resistência três em relação a um biótipo susceptível padrão. O estudo da ciência sobre o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na resistência das plantas daninhas é de extrema importância para o agronegócio, principalmente, por possibilitar a recomendação de práticas de manejo mais eficientes em tais situações e, desta forma, reduzir a pressão de seleção exercida pelos herbicidas. Assim sendo, este trabalho foi conduzido com o objetivo de (a) analisar o padrão de acúmulo de ácido shiquímico, (b) avaliar o comportamento das variáveis fisiológicas, (c) caracterizar a superfície foliar e analisar a composição das ceras epicuticulares e (d) caracterizar a absorção foliar e a translocação do ^{14}C -glyphosate, na planta daninha *L. multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao herbicida glyphosate. O biótipo S acumulou três, cinco, três e 10 vezes mais ácido shiquímico as 24, 48, 72 e 96 horas após tratamento (HAT) em comparação ao biótipo R. O herbicida glyphosate inibiu a fotossíntese líquida e a eficiência do uso da água, assim como estimulou a transpiração e a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 no biótipo S. Entretanto, no biótipo R a fotossíntese líquida e a taxa interna/externa de CO_2 permaneceram constantes, durante todo o experimento, prontamente inibindo a transpiração e incrementando a eficiência do uso da água, demonstrando a capacidade recuperativa do biótipo R. As variáveis quantificação e composição química das ceras epicuticulares não apresentaram distinção entre R e S. Todavia, o padrão de distribuição dos tricomas em pares, na superfície adaxial, no biótipo R difere da distribuição individualizada do biótipo S. Os resultados de absorção demonstraram que os biótipos R e S não diferem entre si, contudo o padrão de translocação do ^{14}C -glyphosate foi diferente. No biótipo R, houve uma maior translocação do ^{14}C -glyphosate para as regiões das plantas que não receberam o tratamento, com o glyphosate, às 48 HAT. Todavia, este padrão somente foi observado no biótipo S às 72 HAT. O movimento do glyphosate pelo floema segue a mesma rota dos produtos fotoassimilados, portanto, o transporte deste herbicida é diretamente proporcional ao transporte dos carbonos assimilados pela planta, como se constatou no biótipo R. Assim, os baixos níveis de acúmulo de ácido shiquímico constatados no biótipo R indicam que o herbicida glyphosate não é totalmente inibido de atuar na EPSPs ou que a EPSPs pode ser parcialmente inibida pelo glyphosate, permanecendo na forma ativa. Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que (a) a resistência da planta daninha *Lolium multiflorum* ao herbicida glyphosate, provavelmente, não é atribuída a um único mecanismo de resistência, e (b) a maior translocação do herbicida no biótipo resistente representa um mecanismo de resistência ao glyphosate, sendo necessários estudos relacionados à expressão e à sensibilidade da EPSPs para elucidar a possibilidade de outros mecanismos de resistência envolvidos neste biótipo.

Palavras-chave: Absorção; Ácido shiquímico; Azevém, Fotossíntese; Translocação; Tricomas

MECHANISMS OF GLYPHOSATE RESISTANCE IN *Lolium multiflorum*

Abstract

The continuous use of herbicide with a single mechanism of action results in selection pressure of resistant weed biotypes. A glyphosate-resistant biotype of *Lolium multiflorum* was selected after unsuccessful applications of glyphosate. This biotype was three-fold resistant to glyphosate compared with the standard susceptible biotype. The study of the mechanism(s) that confer glyphosate-resistance in weeds is extremely important for the agribusiness, mainly to make possible the recommendation of more efficient weed management practices and the reduction of the selection pressure. Likewise, the main objectives of this work were to (a) analyze the pattern of shikimic acid accumulation, (b) evaluate the behavior of physiological processes affected by glyphosate, (c) characterize both foliar surface and epicuticular waxes composition, (d) characterize the ^{14}C -glyphosate leaf uptake and translocation, in the *L. multiflorum* glyphosate-resistant (R) and -susceptible (S). The S biotype accumulated three, five, three and 10 times more shikimic acid in leaf tissue 24, 48 and 72 hours after treatment (HAT) than R biotype. The glyphosate herbicide inhibited the net photosynthesis and the water use efficiency, as well as it stimulates the transpiration and the internal/external CO_2 ratio in the S biotype. However, in the R biotype the net photosynthesis and the internal/external CO_2 ratio stay constant during the whole assay, soon inhibits the transpiration and it increases the water use efficiency. This pattern demonstrates the recover capacity of the R biotype. There were not differences between both R and S, neither the amount of epicuticular waxes, nor their chemical composition. However, the pattern of trichomes distribution on pairs in the adaxial surface of the R biotype differs from the single distribution of S one. There were no differences between the S and the R in ^{14}C -glyphosate leaf uptake; though the pattern of ^{14}C -glyphosate translocation was significantly different. In the R biotype, there was a greater percentage of ^{14}C -glyphosate absorbed by the plant moved to the untreated section at 48 HAT, nevertheless this pattern was only observed in the S biotype at 72 HAT. The movement of glyphosate in the phloem follows the same route of the carbon fixed by photosynthesis, therefore, conditions that favor the photosynthesis also aid the translocation of the glyphosate, as verified in the R biotype. As well as the low levels of shikimic acid accumulation in the R indicates that either glyphosate is not totally excluded from acting in EPSPs or that EPSPs can be partially inhibited by glyphosate, staying in the active form. The results obtained in this research allow concluding that: (a) the resistance of the weed *Lolium multiflorum* to the herbicide glyphosate is not checked, probably, by a single action mechanism and (b) the greatest translocation of the herbicide in the plant acts as one of the resistant mechanism. Studies related to the expression and the sensibility of EPSPs are necessary to elucidate the possibility of other resistance mechanisms in this biotype.

Keywords: Italian ryegrass; Photosynthesis; Shikimic acid; Translocation; Trichomes; Uptake

3.1 Introdução

Os herbicidas são, freqüentemente, a forma disponível de controle das plantas daninhas com melhor relação entre custo e benefício, em muitos países (MONQUERO, 2003). No entanto, a aplicação em anos ou safras sucessivas de determinadas moléculas de herbicidas pertencentes ou não ao mesmo mecanismo de ação tem conduzido a pressão de seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a estes herbicidas (CHRISTOFFOLETI, LÓPEZ-OVEJERO, 2004). A evolução da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate é preocupante na economia agrícola, pois este herbicida é essencial a sustentabilidade do sistema de plantio direto e a utilização da tecnologia de culturas geneticamente modificadas para conferir tolerância ao glyphosate (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003). Pelo menos 183 espécies de plantas daninhas foram selecionadas para resistência aos herbicidas, no mundo; cerca de nove novos casos reportados a cada ano (HEAP, 1997; WEED SCIENCE, 2008). Atualmente, casos de resistência envolvendo glyphosate têm sido relatadas em doze espécies de plantas daninhas (WEED SCIENCE, 2008). Por conseguinte, é evidente que este herbicida apresenta um potencial reduzido de seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas, comparativamente a herbicidas de outras classes (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004).

Segundo Christoffoleti e López-Ovejero (2004), algumas características que podem explicar o reduzido potencial de seleção de biótipos resistentes ao glyphosate seriam: (a) sem residual no solo; (b) baixa adaptabilidade ecológica dos indivíduos sobreviventes; (c) baixa freqüência inicial de plantas resistentes; (d) ausência de outros herbicidas com o mesmo mecanismo de ação; (e) ausência na natureza de espécies degradativas de quantidades significativas de glyphosate; e (f) múltiplos mecanismos fisiológicos que interagem na definição da susceptibilidade ao glyphosate. Relativo a esta última característica e às condições de aplicação em pós-emergência do herbicida glyphosate, sua eficácia é função dos processos de retenção, penetração, translocação e inibição da enzima alvo (KIRKWOOD; McKAY, 1994).

A absorção do herbicida glyphosate é um processo bifásico, representado por uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida de absorção simplástica lenta através dos tecidos vasculares (MONQUERO, 2003). A cutícula representa a principal barreira protetora contra a entrada dos produtos químicos (HEREDIA, 1998). A compreensão das propriedades protetoras da cutícula requer o conhecimento da composição qualitativa e quantitativa das ceras epicuticulares e das estruturas distribuídas na superfície foliar.

O mecanismo de ação do glyphosate é a inibição da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) na rota do shiquimato (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980), na qual ocorre a síntese dos aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e outros compostos, incluindo as vitaminas (K e E), as proteínas, os alcalóides, a lignina, os flavonóides, as coumarinas, o ácido indolacético (IAA), o teor de clorofila, os carotenóides, os benzoatos e os quinatos, que representam as substâncias responsáveis pelo desenvolvimento das plantas (AMRHEIN et al., 1980; ANDERSON; JOHNSON, 1990; BENTLY, 1990; DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; ARNAUD et al., 1994; HERRMANN; WEAVER, 1999). Geiger e Bestman (1990) sugeriram que a ação fitotóxica da molécula glyphosate pode influenciar na translocação dos fotoassimilados desde os tecidos fonte até os tecidos dreno. Esta inibição ocorre devido a uma mudança na alocação do carbono nos cloroplastos das folhas do tipo fonte, fotossinteticamente ativas, decorrente do bloqueio da síntese da EPSP pelo herbicida glyphosate, acarretando na acumulação do shiquimato e no decréscimo da ribulose bisfosfato e do ácido fosfoglicérico.

O desvio do fluxo de carbono do ciclo de Calvin para a rota do shiquimato, assim como o decorrente acúmulo de ácido shiquímico, foi explicado como sendo responsável pelo efeito inibitório no crescimento das plantas após a aplicação do herbicida glyphosate (FISCHER et al., 1986). A translocação do herbicida glyphosate ocorre, preferencialmente, no floema, ou seja, simultaneamente a rota dos produtos fotossintéticos (açúcares), ocorrendo desde as folhas fotossinteticamente ativas (fonte) aos tecidos que utilizam estes fotoassimilados (drenos) (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

Muitos herbicidas causam o rompimento das membranas, normalmente como um efeito secundário, e isto afeta a integridade dos sistemas de transporte, particularmente o floema. Difenzoquat, por exemplo, produziu este efeito no local da *Avena fatua* que recebeu a aplicação do produto, sendo distinto do efeito constatado em toda a planta (MERRIT, 1982); sendo que o local fitotoxicamente afetado reduz o movimento do herbicida para os outros tecidos das plantas. Igualmente, foi demonstrado que o chlorsulfuron afeta sua própria translocação devido à inibição na distribuição dos assimilados em *Thlaspi arvense* e *Fagopyrum tataricum* (VANDEN BORN; BESTMAN; DEVINE, 1988). Estudos detalhados do efeito da molécula do glyphosate na assimilação do carbono e na translocação deste no floema, determinaram que este herbicida de ação lenta, rapidamente inibe a distribuição dos carbonos na síntese dos amidos (compostos de reserva) durante a fotossíntese. Como consequência desta redução nos níveis de amido durante a

fase luminosa da fotossíntese, é inibida a exportação de sacarose durante a fase escura como o glyphosate é distribuído pelo fluxo do carbono via floema, seu movimento também é reduzido (GOUGLER; GEIGER, 1984; GEIGER; KAPITAN, TUCCI, 1986; SERVAITES; TUCCI; GEIGER, 1987).

Em geral, a ação de um herbicida pode ser compreendida em duas fases. A primeira fase envolve o movimento do herbicida até o local de ação, enquanto a segunda fase envolve as consequências metabólicas resultantes da interação do herbicida com seu sítio de ação (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Na primeira fase, o herbicida penetra nas células, difundi-se a curta distância (movimento célula a célula), é transportado a longa distância, ocorre a conversão metabólica do herbicida (ativação ou desativação), e entra nas organelas subcelulares. Na segunda fase, a interação do herbicida com o sítio de ação ocorre e, logo, uma série de consequências fitotóxicas culmina com a morte da planta (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

A maioria dos estudos realizados com a finalidade de elucidar os mecanismos de resistência das plantas daninhas ao herbicida glyphosate não determinaram a importância relativa dos efeitos secundários deste herbicida na evolução desta característica. O objetivo desta pesquisa foi elucidar o(s) mecanismo(s) de resistência, através das análises de acúmulo do ácido shiquímico, da resposta das variáveis fisiológicas, da composição das ceras epicuticulares, da caracterização da superfície foliar, da absorção e da translocação do glyphosate em *Lolium multiflorum* resistente e susceptível ao herbicida glyphosate.

3.2 Material e métodos

Os experimentos determinativos do acúmulo de ácido shiquímico e das respostas fisiológicas, assim como os estudos da composição das ceras epicuticulares e dos mecanismos de resistência ao glyphosate nas plantas, foram conduzidos nas instalações do Departamento de Química Agrícola y Edafologia da Universidad de Córdoba – Espanha, durante o primeiro semestre de 2007, sob a supervisão do Prof. Dr. Rafael de Prado Amián. Os estudos de caracterização da superfície foliar foram desenvolvidos nas instalações do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo – Piracicaba, durante o segundo semestre de 2007.

Os experimentos foram conduzidos empregando-se um biótipo de *Lolium multiflorum* resistente (R) ao glyphosate proveniente do município de Tabejara – RS (processo de estabilização da característica de resistência descrito no capítulo 1) e um padrão com susceptibilidade (S) conhecida ao glyphosate (estudo prévios descritos no capítulo 1).

Inicialmente, as sementes destes biótipos foram depositadas em placas de Petri (nove cm de diâmetro) contendo dois discos de papel filtro umedecidos (cinco mL de água destilada) com 20 sementes por biótipo, e conduzidas à câmara de ambiente controlado (16h-luz-29°C e 8h-escuro-18°C, $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para o estímulo ao início do processo germinativo. O transplante foi efetuado no estágio fenológico de primeira folha completamente expandida, sendo realizado em duas etapas. Na primeira etapa, as plântulas foram transplantadas em bandejas de 5 L (25 plantas por bandeja) com a finalidade de efetuar os estudos de acúmulo do ácido shiquímico, de quantificação das respostas fisiológicas e da composição das ceras epicuticulares. Na segunda etapa, as plântulas foram transplantadas em vasos com capacidade de 1 L (3 plantas por vaso) com a finalidade de realizar os estudos de mecanismos de resistência ao glyphosate e da caracterização da superfície foliar. Os recipientes foram preenchidos com areia e matéria orgânica na proporção de 2:1 em volume; em seguida, foram transferidos para uma câmara de crescimento com temperatura dia/noite de 29/18°C, 16 horas de fotoperíodo, $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ radiação fotossinteticamente ativa (RFA) no nível da planta (Li-250A Light Meter®, Li-Cor, EUA), umidade relativa constante de 80% e irrigando-se quando necessário.

3.2.1 Bioensaio de determinação acumulativa de ácido shiquímico

Neste experimento, o delineamento experimental adotado foi do tipo inteiramente ao acaso constituído por um tratamento (aplicação do herbicida) e três repetições. As parcelas experimentais constaram de uma planta por período de avaliação, demarcada dentre as 25 plantas por bandejas. Quando as plantas se encontravam no estágio fenológico de quatro folhas completamente expandidas, o glyphosate (Roundup®, 360 g e.a. L⁻¹) foi aplicado na concentração de 0,42 kg e.a. ha⁻¹ usando uma câmara de aplicação equipada com bico tipo leque Teejet 80.02E, pressão de 200 kPa, consumo de calda de 200 L ha⁻¹ e distância de 50 cm do alvo.

As extrações do ácido shiquímico foram desenvolvidas de acordo com Singh e Shaner (1998), com modificações feitas por Perez-Jones et al. (2007). O tecido foliar empregado na extração do ácido shiquímico proveio da terceira e da quarta folha completamente expandida. Os

tecidos foliares foram seccionados às 24, 48, 72 e 96 horas após tratamento (HAT), e 0,05 g de massa foliar, de cada biótipo, foi inserida em um recipiente contendo 1 mL de HCl (0,25 N). As amostras foram agitadas, congeladas a -20°C, descongeladas e submetidas ao banho-maria por 45 minutos a 37°C. Duas alíquotas de 25 µL, por amostra, foram misturadas com 100 µL de tampão de reação [ácido periódico 0,25% (p/v)/sódio meta-periodato 0,25% (p/v)] e submetidas ao banho-maria por 30 minutos a 37°C. A esta solução adicionou-se 100µL de tampão (0,6 N NaOH/0,22 M Na₂SO₃). O acúmulo de ácido shiquímico foi mensurado espectrofotometricamente (DU 640[®], Beckman Coulter Inc, EUA), usando a metodologia proposta por Cromartie e Polge (2000) a uma densidade óptica de 380 nm. A concentração de ácido shiquímico expressa em µg g⁻¹ de massa fresca foi determinada baseando-se em uma curva. A curva padrão foi determinada usando plantas não tratadas, para cada biótipo, e concentrações conhecidas de ácido shiquímico (Sigma-Aldrich, EUA).

3.2.2 Bioensaio de determinação dos efeitos fisiológicos

Neste experimento, o delineamento experimental, as parcelas experimentais, o tratamento com glyphosate foi realizado como descrito no bioensaio de determinação acumulativa de ácido shiquímico. Avaliou-se a taxa de fotossíntese líquida (*A*), a transpiração (*E*), a eficiência do uso da água (*WUE*) e a relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (*C_i/C_o*), as 0, 4, 24, 48, 72 e 96 HAT. As avaliações foram realizadas na quarta folha completamente expandida, 10 vezes em intervalos de cinco minutos entre medições, para tal empregou-se um analisador de gases de infravermelho portátil (Li-Cor 6400[®], Li-Cor Inc., EUA). O analisador de gases foi calibrado para prover condições constantes de 1500 µmol m⁻² s⁻¹ de fótons de luz (6400-02B fonte de luz tipo LED vermelho-azul), 400 µmol mol⁻¹ de CO₂ (6400-01 CO₂ sistema de injeção), 25°C de temperatura interna da câmara, 500 µmol s⁻¹ de fluxo de ar e 50% de umidade relativa. O aparelho Li-Cor 6400[®] foi calibrado todos os dias, de acordo com as recomendações do fabricante.

O aparelho Li-Cor 6400[®] estima a taxa de fotossíntese líquida (eq. 1) e a transpiração (eq. 2) pela mudança nas concentrações de CO₂ e de H₂O, respectivamente, por unidade de tempo, segundo equações propostas por von Caemmerer e Farquhar (1981):

$$A = \frac{F (C_a - C_r)}{100 S} - C_a E \quad (1)$$

$$E = \frac{F (W_a - W_r)}{100 S (1000 - W_a)} \quad (2)$$

onde A é a taxa de assimilação líquida de CO_2 pela folha ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); F é a taxa de fluxo de ar ($\mu\text{mol s}^{-1}$); C_a e C_r são as concentrações de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$) da amostra e da referência; S é a área foliar (cm^2); E é a taxa de transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e W_a e W_r são as frações molares de água ($\text{mmol H}_2\text{O mol ar}^{-1}$) da amostra e da referência.

A variável fisiológica eficiência do uso da água (WUE) foi determinada pela relação entre a fotossíntese líquida e a transpiração (A/E).

Para a determinação da relação entre a concentração de CO_2 interna e externa (C_i/C_o) empregou-se as equações propostas por von Caemmerer e Farquhar (1981) (eq. 3):

$$C_i = \frac{\left(g_{tc} - \frac{E}{2}\right) C_a - A}{g_{tc} + \frac{E}{2}} \quad (3)$$

onde C_i é a concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$); g_{tc} é a condutância total do CO_2 ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E é a taxa de transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C_a é a concentração de CO_2 da amostra ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$); A é a taxa de assimilação líquida de CO_2 pela folha ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

3.2.3 Caracterização das ceras epicuticulares

Neste experimento, o delineamento experimental adotado foi do tipo inteiramente ao acaso com três repetições por biótipo. As ceras epicuticulares foram extraídas segundo metodologia modificada de Hamilton (1995), em plantas no estágio fenológico de quatro folhas completamente expandidas. Folhas de, aproximadamente, 50 plantas foram introduzidas, separadamente, em recipientes com 200 mL da solução clorofórmio e metanol (3/1, v/v) por 20 segundos, agitando-se suavemente. Os extratos obtidos foram filtrados, sendo o volume destes reduzido em um evaporador rotativo. A quantificação das ceras foi expressa por quantidade de ceras por unidade de área foliar ($\mu\text{g cm}^{-2}$). A determinação da área foliar foi realizada empregando-se o método não-destrutivo pela projeção das folhas em papel milimetrado (ARCILLA; CHAVES, 1995).

Para a análise da composição química das ceras, estas foram ressuspensas em 500 μL de clorofórmio a 100%. Alíquotas de 20 μL deste extrato para cada biótipo foram aplicados sobre placas de cromatografia de camada delgada (TLC plates 5 X 10 cm Sílica gel 60 F_{254} , 250 μm , Merck). Como fase móvel empregou-se benzeno a 100%. Após a migração das amostras, as

placas foram pré-tratadas usando uma solução de TLC (94 mL H₂O, 6 mL H₂SO₄, 1,5 g H₃Mo₁₂O₄₀P e 1 g Ce₂(SO₄)₃). Por conseguinte, primeiramente as placas foram secas a temperatura ambiente e, posteriormente, a 100°C para a revelação das bandas. Os valores de R_f (razão de fluxo) foram determinados de acordo com a fórmula sugerida por Collins, Braga e Bonato (1990) (eq. 4):

$$R_f = \frac{(\text{distância percorrida pela amostra})}{(\text{distância percorrida pelo eluente})} \quad (4)$$

3.2.4 Caracterização da superfície foliar

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura, cinco secções por biótipo foram cortadas da região central das folhas (12 mm²), em plantas no estágio fenológico de quatro folhas completamente expandidas, dispostas inteiramente ao acaso com cinco repetições por biótipo. Estas secções de material vegetal foram depositadas, separadas por biótipo, sobre uma superfície de vidro. Em uma placa de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecido (câmara úmida), colocaram-se os vidros com os espécimes e um recipiente aberto contendo 1 mL de tetróxido de ósmio a 2%. Manteve-se a placa de Petri envolta em papel alumínio por 12 horas. A fixação ocorreu lentamente por vapores de ósmio (KITAJIMA; LEITE, 1999). Após a fixação, o material foi transferido para um recipiente com sílica gel, onde permaneceu por 24 horas, para dessecação. Os espécimes foram aderidos em fita de carbono fixada no suporte de alumínio (Stubs) e foram recobertos com uma camada fina de ouro, 100 Å, usando um metalizador (SCD 050, Balzers, Germany). Desta forma, as amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (DSM 940A, Zeiss, Germany), empregando-se a voltagem de 20 kV. Duas fotos por segmento vegetal foram preservadas.

3.2.5 Estudos de absorção e translocação do glyphosate

Neste experimento, o delineamento experimental adotado foi do tipo inteiramente ao acaso com três repetições para cada período de avaliação. Quando as plantas se encontravam no estágio fenológico de quatro folhas completamente expandidas, estas foram tratadas com ¹⁴C-glyphosate (phosphonomethylene-¹⁴C; 0,0835 MBq mmol⁻¹ de atividade específica; American Radiolabeled Chemicals Inc., Saint Louis, EUA) em mistura com glyphosate comercial (720 g e.a. ha⁻¹, volume de calda de 300 L ha⁻¹), aplicado sobre a face adaxial da terceira folha, na forma de quatro gotas

de 0,5 μL cada uma ($0,0074 \text{ MBq } \mu\text{L}^{-1}$), usando um microaplicador (Hamilton PB6000 Dispenser, Hamilton Co., EUA).

Após a aplicação do herbicida, a absorção e a translocação foram estudadas em diferentes períodos 24, 48 e 72 HAT, nos quais as plantas permaneceram em câmara de crescimento, nas condições já citadas. Após cada período, as plantas foram retiradas dos vasos e divididas em compartimentos (folha tratada, raiz e resto de planta), com o objetivo de quantificar a radioatividade em cada um deles. As folhas tratadas foram lavadas com 3 mL de metanol 80%, a fim de eliminar o herbicida não absorvido. O líquido proveniente desta lavagem foi misturado com líquido de cintilação e levados para posterior medição da radioatividade residual. As outras partes das plantas foram secas separadamente por 48 horas a 50°C e submetidas posteriormente a combustão em um oxidador Packard Sample Oxidizer Modelo 307.

A combustão foi realizada em uma atmosfera rica em oxigênio, de forma que todo ^{14}C presente nas amostras fosse convertido na forma de $^{14}\text{CO}_2$. O $^{14}\text{CO}_2$ desprendido passou através de uma coluna que continha Carbosob como suporte, substância capaz de retê-lo e transformá-lo em carbamato. As amostras de carbamato resultantes de cada tratamento foram coletadas individualmente e adicionadas a 5 mL de líquido de cintilação (Permafluor). A radioatividade contida neste meio foi posteriormente medida em espectrômetro de cintilação líquida, modelo Beckman LS 6000 TA.

A quantidade de herbicida absorvida foi calculada pela equação (eq. 5):

$$\% H abs = \left(\frac{{}^{14}\text{C } tec.ox.}{{}^{14}\text{C } tec.ox. + {}^{14}\text{C } lav.}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde, *H abs* representa o herbicida absorvido pelas plantas, $^{14}\text{C } tec.ox.$ a quantidade de ^{14}C detectado nos tecidos oxidados e $^{14}\text{C } lav.$ a quantidade de ^{14}C detectado na lavagem da folha tratada.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram inicialmente submetidos à análise da variância com aplicação do teste F e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No experimento de assimilação de CO_2 , as curvas foram ajustadas pela regressão não-paramétrica do tipo “lowess” no decorrer do tempo. O procedimento MEANS foi obtido usando o

programa SAS[®] (versão 9.1, SAS Institute Inc, EUA) para obtenção das médias e dos desvios padrões entre os tratamentos.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Bioensaio de determinação acumulativa de ácido shiquímico

O biótipo de *Lolium multiflorum* susceptível (S) ao herbicida glyphosate apresentou maior acúmulo de ácido shiquímico nos tecidos foliares, comparativamente ao biótipo resistente (R), ao ser tratado com este herbicida (Tabela 3.1). O acúmulo de ácido shiquímico entre os biótipos diferenciou-se às 24 HAT (Tabela 3.1). O padrão de maior acúmulo de ácido shiquímico no biótipo S foi contínuo em relação ao período empregado no bioensaio. Porém, o biótipo R apresentou baixa susceptibilidade ao acúmulo de ácido shiquímico (Tabela 3.1). O biótipo S acumulou, aproximadamente, três, cinco, três e 10 vezes mais ácido shiquímico que o biótipo R, respectivamente às 24, 48, 72 e 96 HAT (Tabela 3.1). Entretanto, baixos níveis de acúmulo de ácido shiquímico foram constatados no biótipo R; indicando que este herbicida não é totalmente inibido de atuar em seu sítio de ação (enol-piruvil-shikimato-fosfato sintetase - EPSPs), ou que a EPSPs pode ser parcialmente inibida pelo glyphosate. Estes resultados sugerem que o glyphosate pode ser parcialmente eliminado dos plastídios do biótipo resistente, visto que resulta em uma menor eficiência na inibição da EPSPs.

Tabela 3.1 - Acúmulo de ácido shiquímico (mg g massa fresca⁻¹) no período após aplicação do tratamento (HAT) com glyphosate (420 g e.a. ha⁻¹) nos biótipos de *Lolium multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao herbicida glyphosate

Biótipo	Horas após tratamento (HAT)			
	24	48	72	96
R	0,57 B a	1,19 B a	2,25 B a	1,39 B a
S	1,49 A c	5,95 A b	6,95 A b	14,60 A a
CV(%) = 18,31	F _(biótipo x tempo) = 43,51*		DMS _(linha) = 1,78	DMS _(coluna) = 0,91

* Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou minúsculas iguais na linha, não diferem entre si ao teste Tukey, com 5% de significância.

Resultados similares foram constatados por Lorraine-Colwill et al. (2003), que observaram a relação da característica de resistência ao glyphosate com a diferença no transporte celular do herbicida nas plantas, indicando que este produto não atinge o sítio de ação em alguns tecidos foliares das plantas resistentes. Perez-Jones et al. (2005, 2007) observaram o mesmo padrão de comportamento ao estudarem dois biótipos de *Lolium multiflorum* resistentes ao glyphosate. No entanto, Michitte et al. (2007) constataram um acúmulo de ácido shiquímico três vezes menor no

biótipo de *Lolium multiflorum* resistente ao glyphosate, comparativamente ao biótipo susceptível, somente aos dois dias após o tratamento.

Desta forma, a análise dos níveis de ácido shiquímico nos tecidos das plantas está relacionada à eficácia do glyphosate em inibir a síntese da EPSPs. Um alto acúmulo de ácido shiquímico, relacionado ao tratamento com glyphosate, alude a uma inibição eficiente da EPSPs; reciprocamente, um baixo acúmulo de ácido shiquímico indica a inabilidade do glyphosate em inibir EPSPs (FENG et al., 2004).

Outros autores relatam o acúmulo de ácido shiquímico no tecido foliar após a aplicação do glyphosate em outras espécies resistentes a este herbicida, como *L. rigidum* (BAERSON et al., 2002; SIMARMATA; KAUFMANN; PENNER, 2003; WAKELIN; PRESTON, 2006), *E. indica* (TRAN et al., 1999) e *C. canadensis* (MUELLER et al., 2003; FENG et al., 2004). Por outro lado, não foi observado acúmulo de ácido shiquímico no tecido foliar de plantas geneticamente modificadas como a soja - [*Glycine max* (L.) Merr.] - (SINGH; SHANER, 1998; REDDY; RIMANDO; DUKE, 2004), o algodão - *Gossypium hirsutum* L. - (PLINE et al., 2002) e a canola – *Brassica napus* L. - (NANDULA et al., 2005); assim como na planta daninha *Amaranthus palmeri* resistente ao glyphosate (CULPEPPER et al., 2006).

3.3.2 Bioensaio de determinação dos efeitos fisiológicos

No biótipo susceptível (S), a aplicação do herbicida glyphosate promove uma inibição gradual na fotossíntese líquida (A) desde as 4 HAT até às 96 HAT (Tabela 3.2). Logo na segunda avaliação após aplicação (4 HAT), o decréscimo em A no biótipo S em relação à primeira avaliação (0 HAT) foi de 30%. Essa diferença aumentou progressivamente até 60% às 96 HAT (última avaliação), quando atingiu o menor valor (Tabela 3.2). Constatou-se, que A gradualmente decresce dia a dia, desta forma, o efeito prolongado da molécula está relacionado à morte do biótipo S. Entretanto, o biótipo R não apresentou diferença em relação ao tempo de resposta da variável fisiológica A, permanecendo constante (Tabela 3.2). O comportamento constatado em S reflete o efeito inicial do herbicida glyphosate no processo fotossintético, ou seja, o declínio imediato nos níveis da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), com conseqüente decréscimo nos níveis de outras substâncias químicas intermediárias da fixação de carbono (DUKE; BAERSON; RIMANDO, 2003). Resultados semelhantes foram observados por outros pesquisadores, como

Shaner e Lyon (1979), Fucks et al. (2002), Cardoso et al. (2007), Soares Filho et al. (2007), Ribeiro et al. (2007) e Zapparoli et al. (2007).

Tabela 3.2 - Taxa de fotossíntese líquida (A), transpiração (E), eficiência do uso da água (WUE) e relação entre a concentração de CO_2 interna e externa (Ci/Co), no período após aplicação do tratamento com o herbicida glyphosate (420 g e.a. ha^{-1}) nos biótipos de *Lolium multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao glyphosate

		<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)				
Biótipo	Horas após tratamento (HAT)					
	0	4	24	48	72	96
R	21,41 A a	19,62 A a	19,22 A a	19,61 A a	19,32 A a	19,33 A a
S	22,54 A a	15,94 B b	14,42 B b	12,15 B bc	12,63 B bc	9,10 B c
CV(%) = 16,67		F _(biótipo x tempo) = 2,77 [*]		DMS _(linha) = 5,09		DMS _(coluna) = 1,96
		<i>E</i> (mol m ⁻² s ⁻¹)				
R	3,01 B a	2,93 A ab	2,31 B ab	2,29 B ab	1,89 B b	1,35 B b
S	3,71 A a	2,96 A ab	2,86 A ab	2,74 A ab	3,17 A ab	2,61 A b
CV(%) = 22,34		F _(biótipo x tempo) = 1,01 ^{ns}		DMS _(linha) = 1,06		DMS _(coluna) = 0,41
		<i>WUE</i> (adimensional)				
R	7,18 A b	6,86 A b	8,85 A b	10,29 A ab	11,54 A ab	14,29 A a
S	6,08 A a	5,58 A a	5,19 B ab	4,60 B ab	4,19 B ab	3,33 B b
CV(%) = 38,11		F _(biótipo x tempo) = 2,78 [*]		DMS _(linha) = 1,92		DMS _(coluna) = 4,99
		<i>Ci/Co</i> (adimensional)				
R	0,53 B a	0,50 B a	0,46 B a	0,42 B a	0,50 A a	0,50 B a
S	0,60 A a	0,57 A a	0,53 A a	0,53 A a	0,53 A a	0,63 A a
CV(%) = 17,87		F _(biótipo x tempo) = 0,21 ^{ns}		DMS _(linha) = 0,06		DMS _(coluna) = 0,17

* Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} Valor de F não significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou minúsculas iguais na linha, não diferem entre si ao teste Tukey, com 5% de significância.

O herbicida glyphosate proporcionou um decréscimo parcial na taxa de transpiração (E) foliar no biótipo R, diferenciando-se do valor observado inicialmente às 72 HAT. Neste período, a diferença decresceu a 55%, diferença não mais observada a partir desse momento (Tabela 3.2). Às 96 HAT, o efeito da molécula no biótipo S resultou no decréscimo em E de somente 30%, pouco menos da metade da redução observada no biótipo R (Tabela 3.2). Concenço et al. (2007), ao estudarem a resposta da variável taxa de transpiração em dois biótipos de *L. multiflorum*, resistente e susceptível ao herbicida glyphosate, constataram que o biótipo susceptível ($4,40\ mol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$) apresenta maior taxa de transpiração comparativamente ao biótipo resistente ($1,98\ mol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$).

Em relação à eficiência do uso da água (*WUE*), a aplicação do herbicida glyphosate no biótipo R proporcionou incremento até às 96 HAT, período de máximo efeito do herbicida nesta variável (Tabela 3.2), representando um acréscimo de 50% em relação à primeira avaliação. Porém, a aplicação do herbicida em S resultou no decréscimo de 45% no mesmo período; demonstrando a maior eficiência do biótipo R no uso da água, quando submetido à aplicação do herbicida glyphosate (Tabela 3.2). Fuchs et al. (2002), ao estudarem o efeito fitotóxico do herbicida glyphosate em *Abutilon theophrasti* medikus, constataram a inibição da fotossíntese e conseqüentemente, o incremento na eficiência do uso da água. Concenço et al. (2007) constataram que o biótipo susceptível ($3,80 \text{ mol CO}_2 \text{ H}_2\text{O}^{-1}$) apresenta menor eficiência do uso da água comparativamente ao biótipo resistente ($7,63 \text{ mol CO}_2 \text{ H}_2\text{O}^{-1}$) em estudos realizados com biótipos de *L. multiflorum* resistente e susceptível ao herbicida glyphosate. A maior *WUE* observada no biótipo R representa um possível indicativo de um mecanismo diferencial entre estes biótipos. Este mecanismo poderia ser decorrente de uma menor transpiração durante os períodos de abertura estomática (CONCENÇO et al., 2007). Desta forma, como proposto por estes autores, possivelmente ocorre uma redução na capacidade de bombeamento de água das raízes para as folhas e, conseqüentemente, uma translocação mais lenta e alteração na taxa de transpiração.

A relação entre a concentração de CO_2 interna e externa (C_i/C_o) foi constante em ambos os biótipos, entretanto o biótipo S difere do biótipo R em relação ao tempo de resposta desta variável fisiológica (Tabela 3.2), visto que S apresentou uma concentração interna de CO_2 superior a de R (Figura 3.2). De acordo com Long e Hällgren (1993), a transpiração é limitada pela concentração de CO_2 interno, por ser um processo de difusão. Portanto, a concentração interna de CO_2 é proporcional à taxa de transpiração, sendo assim observada nestes biótipos. O biótipo R incorpora menos CO_2 , pois os estômatos, provavelmente, fecham-se mais rapidamente, evitando o processo de desidratação e, desta forma, acabam capturando quantidades inferiores de CO_2 , comparativamente ao biótipo S (CONCENÇO et al., 2007).

O decréscimo em *E*, observada somente às 96 HAT no biótipo S, está relacionado com a inibição parcial do processo fotossintético ocasionada pelo herbicida glyphosate. Como o processo inibitório da fotossíntese, decorrente do efeito fitotóxico do herbicida glyphosate, causa um acréscimo nos níveis internos de CO_2 , esse fenômeno eventualmente conduziu ao decréscimo de *E* devido à saturação de CO_2 nos tecidos foliares. Entretanto, no biótipo R, o decréscimo em *E* foi decorrente da maior *WUE* nestas plantas, visto que a capacidade fotossintética permaneceu

inalterada em relação à aplicação do herbicida glyphosate. Esta característica pode ser decorrente de alterações nas características da superfície foliar do biótipo R, como a composição qualitativa e quantitativa das ceras epicuticulares, e a evolução de estruturas especializadas como os tricomas. Outra característica, resultante da evolução da resistência neste biótipo, seria a inalteração do transporte dos fotoassimilados via floema. Geiger e Bestman (1990) sugeriram que a ação fitotóxica do herbicida glyphosate poderia influenciar na sua translocação no floema. Este bloqueio acarretaria no incremento dos níveis de shiquimato e no decréscimo da ribulose bifsosfato e do ácido fosfoglicérico.

3.3.3 Caracterização das ceras epicuticulares

A quantidade de ceras por unidade de área foliar ($\mu\text{g cm}^{-2}$) não foi diferente entre os biótipos resistente (R) e susceptível (S), respectivamente, 31,2 e 31,0 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Tabela 3.3). A quantidade de ceras epicuticulares na maioria das plantas varia entre 10 a 200 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (McWHORTER; OUZTS, 1993), embora quantidades superiores a 300 $\mu\text{g cm}^{-2}$, já tenham sido relatadas (BAKER, 1982).

Tabela 3.3 - Quantidade de ceras epicuticulares ($\mu\text{g cm}^{-2}$) nos biótipos de *Lolium multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao glyphosate

Biótipo	Quantidade de ceras epicuticulares ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
R	31,20 A
S	31,00 A
CV(%) = 1,33	F _(biótipo) = 0,35 ^{ns} DMS _(coluna) = 0,93

^{ns} Valor de F não significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna, não diferem entre si ao teste Tukey, com 5% de significância.

As ceras epicuticulares presentes em ambos os biótipos de *L. multiflorum* são constituídas de componentes químicos como alcanos de cadeia longa (> C20), álcoois e ácidos de cadeia longa (> C20), sem distinção entre os biótipos (Figura 3.1). Nos dois biótipos, as ceras possuem na sua composição *n*-alcanos (Rf = 0,99), álcoois (Rf = 0,65-0,66) e *n*-ácidos (Rf = 0,10) (Figura 3.1).

Em geral, álcoois e ácidos tendem a ser mais hidrofílicos que os hidrocarbonetos (*n*-alcanos), sendo o glyphosate altamente hidrofílico (ARNAUD et al., 1994) e apresentando uma retenção duas vezes superior à água devido aos surfactantes presentes nas formulações comerciais (GRANGEOT; CHAUVEL; GAUVRIT, 2006). Um resultado diferente foi obtido por Michitte (2005) em biótipos chilenos de *L. multiflorum* resistente ao herbicida glyphosate, os quais

apresentaram em sua composição química predominância de alcanos, ésteres e álcoois. Apesar da morfologia das ceras ser geneticamente controlada, a quantidade e a distribuição podem ser modificadas através de condições ambientais (BARTHLOTT, 1998), o que poderia explicar as diferenças obtidas entre estes trabalhos.

Figura 3.1 - Cromatografia de camada delgada das ceras epicuticulares extraídas dos biótipos de *L. multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao herbicida glyphosate. Valores de Rf de 0,99, 0,65-0,66 e 0,10 representam, respectivamente, *n*-alcanos, álcoois e *n*-ácidos

De acordo com Hamilton (1995), os hidrocarbonetos estão presentes em quase toda superfície das plantas, variando quantitativamente de traços até 50% de toda a planta, sendo predominantes em poucos casos. Entretanto, neste estudo os *n*-alcanos constituíram um dos componentes químicos predominante na cera epicuticular dos biótipos estudados. Álcoois são também encontrados predominantemente na composição de ceras de muitas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (BAUM; TULLOCH; BAILEY, 1989), como foi observado neste estudo. Este composto não é uma barreira à penetração do herbicida glyphosate, visto que ambos são hidrofílicos. Os álcoois são um dos principais componentes das ceras, variando de pequenas porcentagens até 60% das ceras totais, em função da espécie. Os ácidos podem estar presentes em grande proporção como, por exemplo, 40% da composição das ceras epicuticulares em folhas de sorgo (HAMILTON, 1995).

3.3.4 Caracterização da superfície foliar

A superfície adaxial apresentou apêndices epidérmicos, tricomas, que foram classificados previamente por Metcalf (1960) como “pêlos de formato em garra” (*prickle-hairs*), unicelulares e não glandulares (CUTTER, 1986; ALQUINI et al., 2003). Em *L. multiflorum*, os *pickle-hairs* podem ocorrer isolados ou agrupados na mesma folha das monocotiledôneas e, comumente, disposto sobre as nervuras. Os *prickle-hairs* dispostos nas bordas das folhas são habitualmente mais angulares e fortes, frequentemente diferindo dos localizados em outras regiões da folha (METCALF, 1960). Neste experimento, foi observado que a superfície foliar de ambos os biótipos foi significativamente diferente (Figura 3.2). A superfície adaxial de ambos os biótipos apresenta tricomas numerosos, unicelulares e alongados. Por outro lado, os *prickle-hairs* estão distribuídos em pares no biótipo R e isolados no biótipo S (Figura 3.2). Todavia, nenhuma diferença entre os *prickle-hairs* nas bordas das folhas foi observada no biótipo R, enquanto tal característica foi observada em S (Figura 3.2). Os estômatos estão dispostos em depressão em relação à superfície foliar (Figura 3.2). A deposição das ceras foi de forma cristalina em ambos os biótipos (Figura 3.2), sendo esta uma característica predominante na superfície foliar de muitas espécies de plantas daninhas (HARR et al., 1991) e considerada a principal barreira à penetração do herbicida na cutícula por Holloway (1970).

Os tricomas são muito variados em sua estrutura e distribuição na epiderme. A função dos tricomas não glandulares ainda é desconhecida. Parece ser uma relação causal, ao invés de ser uma funcional (ALQUINI et al., 2003). Neste estudo, a presença de tricomas distribuídos em pares parece ter uma função de proteção contra a absorção do herbicida, visto que podem se modificar em função das condições ambientais, como as aplicações sucessivas de herbicidas (BARTHLOTT, 1998; ALQUINI et al., 2003). O conhecimento sobre a relação entre os tricomas e a deposição e absorção do herbicida é complexo e contraditório. Os tricomas podem impedir o molhamento e a deposição das gotas de pulverização na superfície foliar, e as gotas poderiam romper-se com o impacto nos tricomas (HESS; BAYER; FALK, 1974; HULL; DAVIS; STOLTENBERG, 1992). Hess, Bayer e Falk (1974) sugeriram que o comprimento dos tricomas apresenta menor relevância que densidade dos tricomas, já que os espaços entre os tricomas podem resultar em bolsões de ar em baixo das gotas, o que preveniria o contato destas com a superfície foliar. A distribuição dos tricomas em pares no biótipo resistente possibilita o desconhecimento sobre a influencia dos tricomas na deposição e na absorção do herbicida, desde

que tricomas no biótipo de *L. multiflorum* R ao glyphosate demonstraram não atuar como uma barreira física inicial, e desta forma, não influenciando na movimentação do herbicida dentro da folha.

Figura 3.2 - Superfície foliar adaxial de *L. multiflorum*. (A) Biótipo susceptível, tricomas com distribuição isolada, setas comparativas indicando o detalhe da conformação diferencial dos tricomas da borda foliar em relação aos demais; (B) Biótipo resistente ao glyphosate, seta indicando os tricomas com distribuição em pares; (C) Biótipo susceptível com deposição das ceras cristalinas; (D) Biótipo resistente com deposição das ceras cristalinas; (E) seta indicando estômato disposto em depressão em relação à superfície foliar

3.3.5 Estudos de absorção e translocação do glyphosate

Em média, 61 % do ^{14}C -glyphosate aplicado foi absorvido pela folha os biótipos estudados (Tabela 3.4). Não foi constatado efeito significativo ($P > 0,05$) para a variável absorção foliar do ^{14}C -glyphosate entre os biótipos susceptível (S) e resistente (R) (Tabela 3.4). A absorção do glyphosate pelas folhas até 72 HAT alcançou, em média, cerca de 65 % do produto aplicado

(Tabela 3.4). Estudos realizados em diferentes culturas e condições experimentais têm demonstrado porcentagens de absorção foliar do glyphosate distintas, variando de 6 a 70% (BARIUAN; REDDY; WILLS, 1999; HETHERINGTON et al., 1999; HALL; HART; JONE, 2000; KIRKWOOD et al., 2000; REDDY, 2000; SHARMA; SINGH, 2001; PLINE et al., 2001). Em *Sorghum halepenses* e *Elytrigia repens*, a absorção variou de 7 a 74% durante os períodos de 48 e 120 horas de exposição (McWHORTER; JORDAN; WILLS, 1980; DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Resultado semelhante foi observado por Monquero et al. (2004) que constatarem absorção de 66, 80 e 90% do glyphosate aplicado nas espécies tolerantes ao glyphosate *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*, respectivamente, após 72 horas da aplicação dos tratamentos. Em geral, a parede celular parece oferecer pequena resistência à passagem dos herbicidas para dentro das células. Entretanto, têm-se muitos relatos de herbicidas sendo acoplados aos constituintes da parede celular, como 2,6-dichlorobenzonitrile (DELMER; READ; COOPER, 1987) em algodão, e paraquat e trifluralin em *Conyza canadensis* (STRANG; ROGERS, 1971). Essa ligação dos herbicidas com a parede celular pode prevenir que quantidades fitotóxicas do herbicida alcancem seu sítio de ação. Tal aspecto, até o momento, não foi relatado com o herbicida glyphosate, entretanto estudos mais detalhados são necessários para justificar tal hipótese.

Embora a absorção tenha sido similar entre os biótipos, o comportamento da translocação do ^{14}C -glyphosate foi diferente. Observou-se uma diferença na proporção de ^{14}C -glyphosate no seu padrão de distribuição nos biótipos, desde a folha tratada até às demais partes das plantas. A translocação foi detectada desde as 24 HAT, quando se observou cerca de 7,87 % e 1,01 % do glyphosate absorvido presente nas raízes do biótipo S e R, respectivamente (Tabela 3.5). Às 24 HAT, 4,01 % do ^{14}C -glyphosate absorvido pelo biótipo R translocou para as demais partes da planta, em contraste a 22,46 % no biótipo S (Tabela 3.5). Entretanto, às 48 HAT, o biótipo S apresentou maior porcentagem de ^{14}C -glyphosate na folha tratada, comparativamente ao biótipo R, ou seja, o padrão inverso ao observado às 24 HAT. Desta forma, não ocorreu translocação no biótipo S. O biótipo R apresentou maior porcentagem de ^{14}C -glyphosate nas partes não tratadas; demonstrando a capacidade de mobilização no biótipo R (Tabela 3.5). Às 72 HAT, o biótipo S apresentou a maior porcentagem de ^{14}C -glyphosate nas folhas não tratadas, entretanto os biótipos não diferiram entre si com relação à parte da planta analisada (Tabela 3.5). Os resultados, portanto, indicam que esse herbicida se movimenta rapidamente pela planta, e esse movimento

está associado às velocidades de transporte dos açúcares no floema, que são elevadas e, em geral, podem variar de 0,3 a 1,5 m h⁻¹ (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Tabela 3.4 - Porcentagem de absorção do ¹⁴C-glyphosate aplicado nos tecidos foliares de *L. multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao herbicida glyphosate no decorrer do tempo após aplicação do tratamento (HAT) com glyphosate (720 g e.a. ha⁻¹)

Biótipo	¹⁴ C-glyphosate (% absorvido)		
	24	48	72
R	42,37 A b	72,83 A a	65,50 A a
S	50,81 A a	70,81 A a	64,03 A a
CV (%) = 16,40	F(biótipo x tempo) = 0,35 ^{ns}		DMS(linha) = 21,72 DMS(coluna) = 14,14

^{ns} Valor não significativo de F a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna, para o mesmo biótipo, ou minúsculas iguais na linha, não diferem entre si ao teste de Tukey, com 5% de significância.

Tabela 3.5 - Taxa de translocação de ¹⁴C-glyphosate, em relação ao ¹⁴C-glyphosate absorvido, da folha tratada às outras partes da planta em de *L. multiflorum* susceptível (S) e resistente (R) ao herbicida glyphosate no período após aplicação do tratamento (HAT) com glyphosate (720 g e.a. ha⁻¹)

HAT	Biótipo	¹⁴ C-glyphosate (% absorvido)		
		Folha tratada	Folhas não tratadas	Raíz
24	S	77,54 B a	14,59 A b	7,87 A b
	R	95,80 A a	3,19 B b	1,01 A b
CV (%) = 21,50		F(biótipo x parte) = 4,97*	DMS(linha) = 15,55	DMS(coluna) = 10,12
48	S	76,93 A a	16,73 B b	6,35 A b
	R	30,82 B a	60,21 A a	8,97 A a
CV (%) = 75,18		F(biótipo x parte) = 3,20 ^{ns}	DMS(linha) = 54,37	DMS(coluna) = 35,40
72	S	12,08 A b	65,90 A a	41,19 A ab
	R	8,10 A b	59,15 A a	32,75 A ab
CV (%) = 36,66		F(biótipo x parte) = 0,03 ^{ns}	DMS(linha) = 29,05	DMS(coluna) = 18,92

* Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} Valor de F não significativo ao nível de a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna, para o mesmo biótipo, ou minúsculas iguais na linha, não diferem entre si ao teste de Tukey, com 5% de significância.

Resultados semelhantes foram observados por Monquero (2003), ao estudar o mecanismo que confere a característica de tolerância ao herbicida glyphosate na planta daninha *Commelina benghalensis*. O autor constatou não haver barreira para a translocação deste herbicida, visto que, às 72 HAT, 14,1 % do ¹⁴C-glyphosate absorvido foi observado na parte aérea e 11,2 % no sistema radicular. Geiger, Wen-Jang e Fuchs (1999), ao estudarem as causas da auto-indução do glyphosate que acarreta na limitação da translocação deste herbicida em *Beta vulgaris* (L.) geneticamente modificada (GM) para conferir tolerância à molécula glyphosate, observaram que *B. vulgaris*-GM translocou significativamente até as 30 HAT, período este representado pela última avaliação, enquanto o *B. vulgaris* susceptível teve a translocação do herbicida inibida às 10 HAT, exportando apenas metade do ¹⁴C-glyphosate absorvido. Hetherington et al. (1999), ao

estudarem os aspectos fisiológicos relacionados com a eficácia do herbicida glyphosate em *Zea mays* (L.) var. Bonnie geneticamente modificado para conferir a característica de tolerância ao herbicida glyphosate constataram que *Z. mays*-GM apresentou uma maior translocação do herbicida em relação à linhagem susceptível, sendo que praticamente todo o ^{14}C -glyphosate absorvido foi translocado da folha tratada na variedade-GM, enquanto que na variedade susceptível a maior porcentagem de ^{14}C -glyphosate permaneceu nas folhas tratadas. Entretanto, a maioria dos trabalhos científicos com a finalidade de elucidar o mecanismo de resistência das plantas daninhas ao glyphosate encontraram resultados adversos a estes (FENG; PRATLEY; BOHN, 1999; PRATLEY et al., 1999; TRAN et al., 1999; LEE; NGIM, 2000; VanGESSEL, 2001; BAERSON et al., 2002; LORRAINE-COLWILL et al., 2003; FENG et al., 2004).

A distribuição dos herbicidas no mesmo padrão dos fotoassimilados não é desejável. Se os herbicidas fossem distribuídos com um padrão idêntico ao dos assimilados, alguns tecidos acumulariam quantias relativamente grandes, enquanto outros receberiam pequeno ou nenhum herbicida. Os tecidos de formação seriam mortos, enquanto os demais escapariam dos efeitos do herbicida, resultando em incompleto controle (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Por exemplo, a distribuição equilibrada do glyphosate no sistema radicular de *Agropyron repens* pode resultar em morte dos brotos e do ápice dos rizomas, mas sobrevivência de brotos mais próximos da base das folhas tratadas (STOLTENBERG; WYSE, 1986; HARKER; DEKKER, 1988). Geiger e colaboradores (GEIGER; KAPITAN; TUCCI, 1986; GEIGER; BESTMAN, 1990; SERVAITES; TUCCI; GEIGER, 1987) demonstraram que o glyphosate afeta a fixação do carbono através do efeito nos níveis da ribulose bisfosfato (RuBP) e na produção de amido (Figura 3.3). O efeito nos níveis da RuBP é uma consequência indireta da inibição da síntese da EPSP, através do glyphosate; desregulação na rota do shiquimato causa um excesso de shikimate-3-fosfato a ser produzido (Figura 3.3). Como resultado, tem-se a divergência do carbono do ciclo de Calvin que eventualmente diminui a quantia da RuBP disponível para a fixação do carbono (Figura 3.3). Inicialmente, os açúcares derivados do amido mantêm a provisão de assimilados para a translocação, mas eventualmente o amido esgota (Figura 3.3). O mecanismo que confere a susceptibilidade ao herbicida glyphosate em *L. multiflorum*, proposto por Geiger e Bestman (1990) e constatado neste trabalho no biótipo susceptível, foi ilustrado na figura 3.3. A capacidade do glyphosate não ser auto-inibido no biótipo resistente não provoca as reações descritas na Figura 3.3 e desta forma, não afeta o desenvolvimento da planta daninha.

Figura 3.3 - Mecanismo proposto pelo qual o herbicida glyphosate limita sua própria translocação devido aos efeitos no metabolismo do carbono nas folhas do tipo fonte. 1. Bloqueio da síntese dos aminoácidos aromáticos; 2. Desvio do carbono para formação do shiquimato-3-fosfato; 3. Redução do carbono disponível para o ciclo de Calvin; 4. Decréscimo da síntese de amido e decréscimo da exportação da triose para o citoplasma; 5. Decréscimo do transporte dos fotoassimilados para o floema; RuBP. ribulosa 1,5 bisfosfato; RuMP. ribulosa 5 fosfato; TP. ácido 1,3 bisfosfo-glicérico; 3PGA. gliceraldeído 3 fosfato; E4P. eritrose-3-fosfato; PEP. phenolpyruvate; DAHP. 3-desoxi-arabinoheptulsonato-7-fosfato; SHK3P. shiquimato; AROAA. aminoácidos aromáticos. Adaptado de Geiger e Bestman (1990)

A decomposição do herbicida em CO_2 , para quantificar a translocação do mesmo, pode envolver a subsequente perda de glyphosate pela planta. Desta forma o ^{14}C encontrado representa uma porção intacta do glyphosate. Essa premissa é baseada no período curto de experimentação e no fato de que o metabolismo do glyphosate é geralmente relatado como muito lento ou não existente nas plantas superiores (HETHERINGTON et al., 1999). Por outro lado, perda de glyphosate (ou de ^{14}C) não necessariamente significa uma degradação deste herbicida (RODRIGUES; WORSHAM; CORBIN, 1982). Desta forma, a diferença da variável translocação do ^{14}C -glyphosate entre os biótipos foi confirmada pelas radiografias (Figura 3.4). Na radiografia a intensidade da cor vermelha representa a maior concentração de ^{14}C -glyphosate, seguida pela coloração azul e pela cor cinza, assim como os compartimentos sem coloração representam a ausência da presença de glyphosate translocado para tais regiões. Para visualizar tal situação foi disponibilizada a imagem da planta ao lado da respectiva radiografia.

Figura 3.4 - Radiografias da translocação do ^{14}C -glyphosate pelos tecidos vegetais de *L. multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao herbicida glyphosate às 24, 48 e 72 horas após tratamento com glyphosate (720 g e.a. ha^{-1}). A seta indica o local de aplicação do ^{14}C -glyphosate

3.4 Conclusões

- (a) As variáveis quantificação e composição química das ceras epicuticulares não apresentam distinção entre os biótipos resistente e susceptível.
- (a) A distribuição dos tricomas em pares no biótipo resistente não resultou em diferença na absorção do herbicida glyphosate.
- (a) A absorção diferencial do herbicida glyphosate não foi constatada entre os biótipos resistente e susceptível.
- (a) A planta daninha *L. multiflorum* apresenta como provável mecanismo de resistência a maior translocação do herbicida glyphosate, devido ao fato de não ocorrer à auto-inibição do transporte deste herbicida pelo floema.
- (a) O herbicida glyphosate não afeta as variáveis fotossíntese líquida e taxa interna/externa de CO₂, assim como inibe a transpiração e incrementa a eficiência do uso da água, devido ao mecanismo de resistência que não inibide a assimilação do carbono.
- (a) O baixo nível de acúmulo de ácido shiquímico, no biótipo resistente, indica que o herbicida glyphosate não é totalmente inibido de atuar em seu sítio de ação. Desta forma, a resistência da planta daninha *L. multiflorum* ao glyphosate, provavelmente, não é atribuída a um único mecanismo de resistência.
- (a) Estudos relacionados à expressão e a sensibilidade da EPSPs são necessários para elucidar a possibilidade de outros mecanismos de resistência.

Referências

- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M.R.T.; DA COSTA, C.G.; BARROS, C.F.. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomía vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. cap. 3. p. 87-108.
- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.
- ANDERSON, K.S.; JOHNSON, K.A. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from EPSPs synthase. **Chemical Review**, Boulder, v. 90, n. 7, p. 1131-1149, 1990.
- ARCILA, J.; CHAVES, B. Desarrollo foliar del cafeto en tres densidades de siembra. **CENICAFE**, Viçosa, v. 46, p. 5-20, 1995.
- ARNAUD, L.; NURIT, F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Distribution glyphosate and its target enzyme inside wheat plants. **Pesticide Science**, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 217-223, 1994.

- BAKER, E.A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D. F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. (Ed.) **The plant cuticle**. London: Academic Press, 1982. p. 140-161.
- BAERSON, S.R.; RODRIGUEZ, D.J.; BIEST, N.A.; TRAN, M.; YOU, J.; KREUGER, R.W.; DILL, G.M.; PRATLEY, J.E.; GRUYS, K.J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Ithaca, v. 50, n. 6, p. 721-730, 2002.
- BARIUAN, J.; REDDY, K.; WILLS, G. Glyphosate injury, rainfastness, absorption, and translocation in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v. 13, p. 112-119, 1999.
- BARTHLOTT, W. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Journal of Linnean Society of Botany**, London, v. 126, p. 237-260, 1998.
- BAUM, B. R.; TULLOCH, A. P.; BAILEY, L. G. Epicuticular waxes of the genus *Hordeum*: a survey of their chemical composition and ultrastructure. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, n. 11, p. 3219-3226, 1989.
- BENTLY, R. The shikimate pathway metabolic tree with many branches. In: FASMAN, G.D. (Ed.). **Critical review in biochemistry and molecular biology**. Boca Raton: CRC Press, 1990. chap. 3, p. 307-384.
- CAEMMERER, S. von; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, Heidelberg, v. 153, n. 4, p. 376-387, 1981.
- CARDOSO, L.A.; SOARES FILHO, S.I.B.; ZAPPAROLI, R.A.; SOUZA, A.V.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J.D. Eficiência de controle e respostas das trocas gasosas na espécie *Commelina erecta* sob diferentes doses de glyphosate. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos ...** Botucatu: FCA, 2007. 1 CD-ROM.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004. p. 39-40.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução aos métodos cromatográficos**. 4.ed. Campinas: UNICAMP, 1990. 279 p.
- CONCENÇO, G.; FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; VIANA, R.G.; D'ANTONIO, L.; VARGAS, L.; FIALHO, C.M.T. Uso da água em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) em condição de competição. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 449-455, 2007.
- CROMARTIE, T.H.; POLGE, N.D. An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. **Proceeding Weed Science Society**, Champaign, v. 40, p. 291, 2000.

CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; VENCILL, W.K.; WEBSTER, T.M.; BROWN, S.M.; YORK, A.C.; DAVIS, J.W.; HANNA, W.W. Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. **Weed Science**, Ithaca, v. 54, n. 4, p. 620-626, 2006.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. pt. 1: Células e tecidos, 304 p.

DELMER, D.P.; READ, S.M.; COOPER, G. Identification of a receptor protein in cotton fibers for the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 4, p. 1382-1386, 1987.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: PTR Prentice Hall, 1993. 441 p.

DUKE, S.O.; BAERSON, S.R.; RIMANDO, A.M. **Glyphosate**. New York: Wiley, 2003. 120 p.

FENG, P.C.C.; PRATLEY, J.E.; BOHN, J.A. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Ithaca, v. 47, p. 412-445, 1999.

FENG, P.C.C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, R.D.; HECK, G.R.; CAJACOB, C.A. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Ithaca, v. 52, n. 4, p. 498-505, 2004.

FISCHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 168, n. 3, p. 1147-1154, 1986.

FUCKS, M.A.; GEIGER, D.R.; REYNOLDS, T.L.; BOURQUE, J.E. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti medikus*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 74, n. 1, p. 27-39, 2002.

GEIGER, D.R.; BESTMAN, H.D. Self-limitation of herbicide mobility by phytotoxic action. **Weed Science**, Ithaca, v. 38, p. 324-329, 1990.

GEIGER, D.R.; KAPITAN, S.W.; TUCCI, M.A. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. **Weed Research**, Rockville, v. 82, n. 2, p. 468-472, 1986.

GEIGER, D.R.; WEN-JANG, S.; FUCHS, M.A. Causes of self-limited translocation of glyphosate in Beta vulgaris plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 124-133, 1999.

GOUGLER, J.A.; GEIGER, D.R. Carbon partitioning and herbicide transport in glyphosate. **Weed Science**, Ithaca, v. 32, n. 4, p. 546-551, 1984.

GRANGEOT, M.; CHAUVEL, B.; GAUVRIT, C. Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in Ambrosia artemisiifolia. **Weed Research**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 152-162, 2006.

HALL, G.; HART, C.; JONE, C. Plants as source of cations antagonistic to glyphosate activity. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 4, p. 351-358, 2000.

HAMILTON, R. J. **Waxes: chemistry, molecular biology and functions**. Edinburgh: Orly Press, 1995. 349 p.

HARKER, K.N.; DEKKER, J. Effects of phenology and translocation patterns of several herbicides in quackgrass, *Agropyron repens*. **Weed Science**, Ithaca, v. 36, p. 463-472, 1988.

HARR, J.; GUGGENHEIM, R.; SCHULKE, G.; FALK, R.H. **The leaf surface of major weeds**. Lawrence: Weed Society of America, 1991. 11 p.

HEAP, I.M. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. **Pesticide Science**, London, v. 51, n. 3, p. 235-243, 1997.

HEREDIA, A. La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecologia**, v. 12, p. 293-305, 1998.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

HESS, F.D.; BAYER, D.E.; FALK, R.H. Herbicide dispersal patterns: I. As a function of leaf surface. **Weed Science**, Ithaca, v. 22, p. 394-401, 1974.

HETHERINGTON, P.R.; REYNOLDS, T.L.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R.C. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 339, p. 1567-1576, 1999.

HOLLOWAY, P.J. Surface factors affecting the wetting of leaves. **Pesticide Science**, London, v. 1, n. 4, p. 156-163, 1970.

HULL, H.M.; DAVIS, D.G.; STOLTENBERG, G.E. Actions of adjuvant on plant surfaces. In: HODGSON, R.H. (Ed.). **Adjuvants for herbicides**. Lawrence: Weed Science Society of America, 1992. p. 26-67.

KIRKWOOD, R.C.; McKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pesticide Science**, London, v. 42, n. 3, p. 241-249, 1994.

KIRKWOOD, R.C.; HETHERINGTON, R.; REYNOLDS, T.L.; MARSHALL, G. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): influence of herbicide and surfactant concentration. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 4, p. 359-367, 2000.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2.ed. Piracicaba: ESALQ, 1999. 47 p.

LEE, L.J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 4, p. 336-339, 2000.

LONG, S.P.; HÄLLGREN, J-E. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment**: a field and laboratory manual. London: Chapman & Hall, 1993. p. 129-167.

LORRAINE-COLWILL, D.F.; POWLES, S.B.; HAWKES, T.R.; HOLLINSHEAD, P.H.; WARNER, S.A.J.; PRESTON, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 74, p. 62-72, 2003.

McWHORTER, C.G.; OUZTS, C. Leaf surface morphology of *Erythroxylum* sp. and droplet spread. **Weed Science**, Ithaca, v. 42, p. 18-26, 1993.

McWHORTER, C.G.; JORDAN, T.N.; WILLS, G.D. Tranlocation of ¹⁴C glyphosate in soybean (*Glycine max*) and johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Science**, Ithaca, v. 28, n. x, p. 113-118, 1980.

METCALFE, C. R. **Anatomy of the monocotyledons**: I. Gramineae. London: Oxford University Press, 1960. 731 p.

MICHITTE, P. **Mecanismos de resistencia a inhibidores de la EPSP sintasa y ACCasa en un biotipo de *Lolium multiflorum* de Chile austral**. 2005. 205 p. Tese (Doutorado) - Universidad de Córdoba, Córdoba, 2005.

MICHITTE, P.; DE PRADO, R.; ESPINOZA, N.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; GAUVRIT, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, Ithaca, v. 55, n. 5, p. 435-440, 2007.

MONQUERO, P.A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate**. 2003. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MATAS, J.A.; HEREDIA, A. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 203-210, 2004.

MUELLER, T.C.; MASSEY, J.H.; HAYES, R.M.; MAIN, C.L.; STEWART JUNIOR, N. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 3, p. 680-684, 2003.

NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; DUKE, S.O.; POSTON, D.H. Glyphosate-resistant weeds: current status and future outlook. **Outlook Pest Management**, v. 16, p. 183-187, 2005.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C. ; SHANER, D. Identification of glyphosate resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. **Weed Science**, Ithaca, v. 53, n. 6, p. 775-779, 2005.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Heidelberg, v. 226, n. 2, p. 395-404, 2007.

PLINE, W.A.; PRICE, A.J.; WILCUT, J.W.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R. Absorption and translocation of glyphosate in glyphosate-resistant cotton as influenced by application method and growth stage. **Weed Science**, Ithaca, v. 49, n. 4, p. 460-467, 2001.

PLINE, W.A.; WILCUT, J.W.; DUKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non-glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 3, p. 506-512, 2002.

PRATLEY, J.; URWIN, N.; STANTON, R.; BAINES, P.; BROSTER, J.; CULLIS, R.; SCHAFER, D.; BOHN, J.; KRUEGER, R. Resistance to glyphosate in annual ryegrass (*Lolium rigidum*): I Bioevaluation. **Weed Science**, Ithaca, v. 47, n. 4, p. 405-411, 1999.

REDDY, K. Factors affecting toxicity, absorption, and translocation of glyphosate in redvine (*Brunnichia ovata*). **Weed Technology**, Champaign, v. 14, n. 3, p. 457-462, 2000.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 16, p. 5139-5143, 2004.

RIBEIRO, D.N.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRADO, R.; VARGAS, L.; VIVIAN, R.; MARTINS, B.A.B. Photosynthesis and respiration rate of *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) biotypes resistant to glyphosate. In: NATIONAL MEETING AND EXPOSITION OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 233., 2007, Chicago. **Proceedings...** Chicago, 2007. 11 p.

RODRIGUES, J.J.V.; WORSHAM, A.D.; CORBIN, F.T. Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). **Weed Science**, Ithaca, v. 30, p. 316-320, 1982.

SERVAITES, J.C.; TUCCI, M.A.; GEIGER, D.R. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 370-374, 1987.

SHANER, D.L.; LYON, J.L. Stomatal cycling in *Phaseolus vulgaris* L. in response to glyphosate. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p.83-87, 1979.

SHARMA, S.; SINGH, M. Environmental factors affecting absorption and bio-efficacy of glyphosate in florida beggarweed (*Desmodium tortuosum*). **Crop Protection**, Guildford, v. 20, n. 6, p. 511-516, 2001.

SIMARMATA, M.; KAUFMANN, J.E.; PENNER, D. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Ithaca, v. 51, n. 5, p. 678–682, 2003.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, p. 527-530, 1998.

SOARES FILHO, S.I.B.; ZAPPAROLI, R.A.; CARDOSO, L.A.; SOUZA, A.V.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J.D. Influência de diferentes doses de glyphosate na eficiência de controle e na resposta das trocas gasosas em *Commelina benghalensis* L. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos ...** Botucatu: FCA, 2007. 1 CD-ROM.

STEINRÜCKEN, H.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 94, n. 4, p. 1207–1212, 1980.

STOLTENBERG, D.E.; WYSE, D.L. Regrowth of quackgrass (*Agropyron repens*) following postemergence applications of haloxypop and sethoxydim. **Weed Science**, Ithaca, v. 34, p. 664-668, 1986.

STRANG, R.H.; ROGERS, R.L. A microautoradiographic study of ^{14}C -trifluralin absorption. **Weed Science**, Ithaca, v. 19, p. 363-369, 1971.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2004. 719 p.

TRAN, M.; BAERSON, S.; BRINKER, R.; CASAGRANDE, L.; FALETTI, M.; FENG, Y.; NEMETH, M.; REYNOLDS, T.; RODRIGUEZ, D.; SHAFFER, D.; STALKER, D.; TAYLOR, N.; TENG, Y.; DILL, G. Characterization of glyphosate resistant Eleusine indica biotypes from Malaysia. In: ASIAN-PACIFIC WEED SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 17., 1999, Chicago. **Proceedings ...** Bangkok: The Asian-Pacific Weed Science Society, 1999. p. 527–536.

VANDEN BORN, W.H.; BESTMAN, H.D.; DEVINE, M.D. **Factors affecting herbicidal activity and selectivity**. London: Proc. EWRS Sympm, 1988. 69 p.

VanGESSEL, M.J. Glyphosate resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, Ithaca, v. 49, n. 6, p. 703-705, 2001.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate em pomares de maçã. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 617-622, 2004.

WAKELIN, A.M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 432-440, 2006.

WEED SCIENCE. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em: 29 jan. 2008.

ZAPPAROLI, R.A.; SOARES FILHO, S.I.B.; CARDOSO, L.A.; SOUZA, A.V.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J.D. Respostas das trocas gasosas e eficiência no controle de *Commelina diffusa* sob diferentes doses de glyphosate. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos ...** Botucatu: FCA, 2007. 1 CD-ROM

4 MODELAGEM DOS ESTUDOS DE DOSE-RESPOSTA AOS HERBICIDAS: UMA NOVA PROPOSTA

Resumo

Os estudos de dose-resposta têm se tornado uma ferramenta essencial na confirmação de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Os principais modelos matemáticos utilizados não descrevem, precisamente, os dados estimados como fatores biológicos da resistência. Sendo assim, estudos de dose-resposta, parametrizados pelo biótipo de *Lolium multiflorum* resistente ao glyphosate, foram conduzidos com os objetivos de (a) modelar a relação entre os biótipos susceptível (S) e resistente (R) ao glyphosate sob duas variáveis independentes (doses do herbicida, D , e estádios fenológicos, EF), e desta forma, comprovar a hipótese de constância do fator de resistência ($GR_{50}R/S$) nos diferentes EF dos biótipos; e (b) propor um novo modelo de predição que represente os aspectos biológicos. Esse modelo assume as hipóteses 1) para a dose nula ($x = 0$), a variável resposta controle de plantas daninhas será nula ($Z = 0$) e 2) para o controle total da variável resposta ($Z = 100$), a dose do herbicida é infinita ($x = \infty$). Essas suposições restringem a estimativa da variável resposta controle ser superiores a 100%, visto que tal evento seria biologicamente inaceitável, representando uma superestimação dos valores observados. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com oito repetições e os tratamentos foram consequência da interação fatorial entre dois biótipos (R e S), nove D crescentes de glyphosate (0 a 2304 g e.a. ha⁻¹) e quatro EF (0, 3, 7 e 11 números de perfilhos, Np). A variável dependente analisada foi a fitomassa fresca relativa à testemunha (%), FFr aos 21 dias após tratamento. Primeiramente realizou-se uma análise da variância seguida por uma regressão não-linear. Para o primeiro propósito, o modelo não-linear que proporcionou uma descrição precisa da relação entre a FFr - em cada biótipo, nas D e nos EF - foi a seguinte equação: $z = a / \{ [1 + [(x-b)/c]^2] \cdot [1 + [(y-d)/c]^2] \}$, onde z representa a FFr (%) na D (x); y é o EF (Np) e a , b , c e d são parâmetros empíricos. Foram observados os valores de R^2 igual a 0,90 em R e 0,89 em S. Para cada biótipo, ocorre um decréscimo generalizado em relação a fitomassa fresca relativa, comparativamente a respectiva testemunha, com o aumento da dose de glyphosate e com o decréscimo do estágio fenológico ($GR_{50}R/S = -0,0148Np^3 + 0,2986Np^2 - 1,7758Np + 3,439$; $R^2 = 1,0$). Constatou-se os $GR_{50}R/S$ iguais a 3,46; 2,47; 2,42 e 2,91 para os EF de 0, 3, 7 e 11 Np , respectivamente. Para o segundo objetivo, o modelo proposto apresentou o menor quadrado médio do resíduo, comparativamente aos outros modelos utilizados neste tipo de estudo. A variância nas plantas não tratadas é maior que nas plantas tratadas com as maiores doses. Os parâmetros estimados com 5% de intervalo de confiança demonstrarão acurácia. Baseado neste aspecto, conclui-se que o modelo: $Z = 100 - \{ 100 / [1 + [(ax)^b]^c] \}$, onde Z representa a porcentagem de controle na dose x do herbicida e a , b , c são parâmetros empíricos, proporciona um ajuste biológico apropriado aos dados. Estes resultados não somente beneficiam os pesquisadores com relação ao desenvolvimento de estudos mais eficientes em relação à resistência das plantas aos herbicidas, como também ajuda os produtores, permitindo a adoção de técnicas adequadas de manejo e de quantificação da ocorrência de casos de resistência às plantas daninhas.

Palavras-chave: Dose-resposta; Modelos; Regressão não-linear; Resistência aos herbicidas; 3D

MODELING ANALYSIS OF HERBICIDE DOSE-RESPONSE RELATIONSHIPS: A NEW PROPOSAL

Abstract

The use of dose-response studies has become a crucial tool to confirm suspect cases of herbicide-resistant weeds. The main models used in these studies are the logistic or log-logistic ones. However, the estimate values from the observed ones do not describe, precisely, data as a biological factor of resistance; representing a statistical adjustment. As a result, dose-response experiments, parameterized for biotypes of *Lolium multiflorum* resistant to glyphosate, were developed with the objectives of (a) modeling the relation of susceptible (S) and resistant (R) biotype to glyphosate, independently, with two independent variables (doses of herbicide and plant growth stages), and then, accepting or rejecting the hypothesis of constancy of the $GR_{50}R/S$ in the different growth stages of the biotypes using the logistic non-linear regression; and (b) performing a new predictive model with the proposal to explore biological factors. This model assumes the hypothesis 1) for the null dose ($x = 0$), the response variable of weed control will be null ($Z = 0$) and 2) for the full control variable ($Z = 100$), the dose of the herbicide is infinite ($x = \infty$). This fact restricts the estimative of control values superior to 100%, which would not be biologically acceptable, causing an overestimate of the observed data. The experiment layout was a completely randomized design with eight replications and the treatments were consequence of factorial scheme with two biotypes (R and S), nine increasing doses of glyphosate (0 to 2,304 g a.e. ha⁻¹) and four growth stages (0, 3, 7 and 11 number of tillers). The dependent variable analyzed was shoot biomass, as % of untreated control, at 21 days after treatment. The first analysis done was a factorial analysis of variance followed by non-linear regression. For the first purpose, the non-linear model provided a precise description of the relationship among shoot biomass, in each biotypes, doses of herbicide and growth stages by the following equation: $z = a / \{ [1 + [(x-b)/c]^2] \cdot [1 + [(y-d)/c]^2] \}$, where z represents the shoot biomass (% of untreated control) at herbicide dose x ; y is the growth stage represented by number of tillers (Nt) and a , b , c and d are empirical parameters. It was observed R^2 values of 0.90 for R and 0.89 for S biotypes. For each biotype, there was a general decreasing in relative shoot biomass in comparison to its respective untreated controls as glyphosate dose increased and growth stage decreased ($GR_{50}R/S = -0.0148Nt^3 + 0.2986Nt^2 - 1.7758Nt + 3.439$; R^2 values of 1.0). $GR_{50}R/S$ values of 3.46, 2.47, 2.42 and 2.91 for 0, 3, 7 and 11 Nt , respectively, were observed. For the second aim, the non-linear regression showed lower error mean of square than others usual models used for these types of studies. The variance for the untreated plants is higher than the variance for plants that received high doses. Based on these, we concluded that the model: $Z = 100 - \{ 100 / [1 + (ax)^b]^c \}$, where Z represents the percentage of control at herbicide dose x and a , b , c are empirical parameters, provide a precise biological fit to the data. Those results do not only benefits weed scientists in terms of designing more effective studies of resistance to herbicides, but can also assist farmers, permitting them to adopt the correct management and to quantify the occurrence of resistance cases.

Keywords: Dose-response; Herbicide resistance; Models; Non-linear regression; 3D

4.1 Introdução

Modelo é definido como a representação matemática de um sistema ou um processo, enquanto que modelagem é o processo de desenvolvimento dessa representação (DE WIT, 1978). Para a operacionalização do modelo um processo necessário é a simulação do sistema, sendo este um conjunto de elementos e suas inter-relações, que são agrupados com o objetivo de estudar alguma parte do mundo real, sendo que a seleção desses componentes depende dos objetivos do estudo (GARCÍA Y GARCÍA, 2002).

Uma das vantagens dos modelos em relação a processos subjetivos é que as pressuposições dos modelos são explícitas e, portanto sujeitas a questionamentos. Hawthorne (1998) comenta que o uso de modelos preditivos permite que diferentes alternativas de manejo sejam classificadas com relação ao risco de ocorrência de falhas no controle ou ainda diferentes espécies ou populações sejam comparadas quanto às taxas de evolução da resistência a um determinado herbicida. Como ferramenta heurística, a modelagem desse processo facilita o entendimento do papel de cada um dos fatores envolvidos na evolução da resistência e de como genética e ecologia populacional de plantas daninhas alvo se inter-relacionam (MAIA, 2003). Os modelos não-lineares é uma classe muito usada na modelagem de fenômenos da natureza, sejam estes físicos, químicos, biológicos, agrônômicos, etc, para efeito de estudo, comparação ou previsão (CHIAICCHIO, 1993).

A relação entre a dose do herbicida e a resposta da planta é de fundamental importância para a compreensão da eficácia e seletividade dos herbicidas (CHRISTOFFOLETI, 2002). Além disso, qualquer avaliação dos efeitos relativos à constituição química do herbicida, ao genótipo da planta, ao ambiente ou ao adjuvante, apresenta-se através das relações diferenciais entre as curvas de dose-resposta (CHRISTOFFOLETI, 2002). Estas relações reúnem numerosos conceitos relativos à eficácia de herbicida como, seletividade, tolerância, resistência, sinergismo e antagonismo (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995).

No passado os estudos de dose-resposta, freqüentemente, apresentavam como fator negativo de seu emprego o desenvolvimento dos cálculos matemáticos exigidos. A primeira solução para tal aspecto foi a linearização dos dados através do emprego de logaritmo, exponencial, *logit* e transformações de *probit*; porém estas transformações, normalmente, limitavam os aspectos biológicos (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995). Para isso, diversos métodos para estudos do tipo de dose-resposta têm sido desenvolvidos (MOTULSKY;

RANSNAS, 1987; STREIBIG, 1988; SEBER; WILD, 1989; SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995), mas cada método apresenta limitações, principalmente decorrente dos fatores biológicos considerados. Por exemplo, muitos destes métodos não descrevem, biologicamente, os dados com precisão em relação às situações de doses extremas do herbicida (doses elevadas e baixas), assim como, possibilitam a estimação de valores da variável resposta superiores a 100% ou inferiores a 0%. Além disso, o emprego de diversos métodos de estudo de dose-resposta, dificulta a comparação de resultados entre trabalhos científicos (CHRISTOFFOLETI, 2002).

Desta forma, esta pesquisa teve por objetivos modelar a relação entre biótipos de *L. multiflorum* resistente e susceptível ao glyphosate em relação a duas variáveis independentes (dose do herbicida e estágio fenológico) e propor um novo modelo matemático de predição que represente os aspectos biológicos nos estudos de dose-resposta. Possibilitando, de forma geral, a racionalização dos estudos da evolução da resistência em plantas daninhas, principalmente nas áreas com ocorrência de biótipos resistentes ao glyphosate, e a compreensão das bases fenológicas da resistência de plantas daninhas, assim como das alternativas de manejo destas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Descrição dos estádios fenológicos

A classificação das plantas daninhas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, quando ao seu desenvolvimento foi sugerido por Hess et al. (1997). Esta classificação demonstrou maior conveniência e facilidade em seu entendimento, desta forma, visando uma uniformização de linguagem, empregou-se esta classificação. Os estádios fenológicos estudados foram estabelecidos em função da relação entre os tecidos fonte e dreno no decorrer do desenvolvimento da planta, sendo estes: (a) BBCH 13-14, três a quatro folhas verdadeiras, zero número de perfilhos (*Np*); (b) BBCH 22-23, dois a três perfilhos visíveis, três *Np*; (c) BBCH 51, emissão do pendão floral, sete *Np* e (d) BBCH 67, final do florescimento, maioria das pétalas caíram ou estão secas, 11 *Np*. Os estádios fenológicos foram definidos quando 50% + 1 das plantas apresentaram determinada característica de desenvolvimento.

4.2.2 Procedimento experimental

Os experimentos foram conduzidos empregando-se um biótipo de *Lolium multiflorum* resistente (R) ao glyphosate proveniente do município de Tabejara – RS, processo de estabilização

da característica de resistência descrito no capítulo 1, e um padrão com susceptibilidade (S) conhecida ao glyphosate, estudo prévios descritos no capítulo 1.

Inicialmente, as sementes destes biótipos foram depositadas em placas de Petri (nove cm de diâmetro), contendo dois discos de papel filtro umedecidos (cinco mL de água destilada) com 20 sementes por biótipo, e conduzidas à câmara de ambiente controlado (16h-luz-29°C e 8h-escuro-18°C), para estimular o início do processo germinativo. O transplante, das plântulas para os vasos, foi efetuado quando as plântulas apresentaram a primeira folha verdadeira (BBCH 10).

Neste experimento, as parcelas experimentais constaram de vasos com capacidade para 200 mL (BBCH 13-14), 2 L (BBCH 22-23 e 51) e 5 L (BBCH 67), preenchidos com uma mistura 2:1 em volume de areia e matéria orgânica. Os vasos foram mantidos em uma câmara de crescimento com temperatura dia/noite de 29/18°C, 16 horas de fotoperíodo ($1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa constante de 80%. Irrigou-se diariamente visando à manutenção da umidade do solo satisfatória e manteve-se sem a infestação de outras espécies de plantas daninhas através do arranquio manual das mesmas.

O delineamento experimental adotado foi do tipo inteiramente ao acaso com oito repetições na densidade de quatro plantas por vaso, visando uma uniformidade com relação ao estágio fenológico. Os tratamentos foram consequência da interação fatorial entre dois biótipos (R e S), nove doses crescentes de glyphosate (*D*) e quatro estádios fenológicos da planta (*EF*). A lista de tratamento é apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Tratamentos do herbicida glyphosate aplicados sobre os dois biótipos de *Lolium multiflorum*, doses crescentes do herbicida em função do estágio fenológico da planta

Estádios Fenológicos ¹		Dose em g e.a. ha ⁻¹ glyphosate							
BBCH 13-14	0	36	72	144	180	216	360	540	720
BBCH 22-23	0	36	72	144	180	216	360	540	720
BBCH 51	0	144	288	360	576	720	1152	1440	2880
BBCH 67	0	288	576	720	1152	1440	2304	2880	4320

¹ Escala fenológica proposta por Hess et al. (1977).

A condução das aplicações foi realizada em câmara de aplicação contendo um bico tipo leque Teejet 80.02E. O equipamento foi regulado para um volume de calda proporcional a 200 L ha⁻¹ a uma pressão de 200 kPa, mantido à distância de 0,50 m da altura média das plantas. Após a aplicação do herbicida, os vasos retornaram a câmara de crescimento e irrigou-se no dia seguinte, a fim de garantir a absorção foliar do herbicida.

Avaliaram-se as variáveis fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) e eficácia de controle (EC), ambas em percentuais, aos 21 dias após aplicação (DAA). A avaliação de EC foi realizada através da escala visual (ALAM, 1974) e para efeito de ajuste dos modelos aos valores observados, visando à extrapolação dos resultados e facilidade de comparação com outras localidades, foi calculado a FFr conforme a equação (1):

$$FFr_i = \frac{FF_i \times 100}{FF_{\max}} \quad (1)$$

em que FFr_i se refere a fitomassa fresca relativa na i -ésima avaliação (%), FF_i a fitomassa fresca na i -ésima avaliação (g planta⁻¹) e $FF_{\max}$ a fitomassa fresca média observada no tratamento testemunha (g planta⁻¹).

4.2.3 Desenvolvimento dos modelos

4.2.3.1 Modelagem dos estudos de dose-resposta ao herbicida

Os modelos matemáticos previram a integração dos dados obtidos nos experimentos de dose-resposta do herbicida glyphosate na planta daninha *Lolium multiflorum* em função de cada estágio fenológico (uma variável independente – dose do herbicida) e de duas variáveis independentes (dose do herbicida e estágio fenológico). Os modelos de predição assumiram, para todos os cenários de uma comunidade de plantas daninhas, que o arranjo espacial das variáveis dependentes (FFr e EC) está diretamente relacionado com a interação significativa entre a dose empregada e o estágio fenológico das plantas (eq. 2):

$$Controle = f(D; EF) \quad (2)$$

Com o aumento de D , proporcionalmente tem-se o aumento do controle; contudo para o EF esta relação é inversa, com o aumento do EF tem-se a redução do controle (eq. 3):

$$Controle = \frac{f(D)}{f(EF)} \quad (3)$$

Os resultados foram inicialmente submetidos à análise da variância com aplicação do teste F. Em seguida aplicou-se o teste de Tukey, 5% de probabilidade, sobre a decomposição fatorial; e os dados provenientes dos tratamentos foram analisados conjuntamente, sendo ajustados aos modelos de regressão não-linear descritos a seguir. A decisão pela variável dependente foi feita por consequência do menor QM_{res} obtido na análise da variância.

4.2.3.1.1 Modelagem bidimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida

O modelo que ajusta a resposta da planta (controle) em função da dose do herbicida (uma variável independente) mais conhecido e utilizado em experimentos de dose-resposta foi desenvolvido por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995), enumerado por 4:

$$y = a + \frac{b - a}{1 + \left(\frac{x}{GR_{50}} \right)^c} \quad (4)$$

em que y representa FFr ou EC em percentagem, na dose do herbicida x , a é o limite inferior da curva, b é o limite superior da curva, d é a declividade da curva em torno do GR_{50} . GR_{50} representa a dose do herbicida, em gramas do equivalente ácido por hectare, que proporciona 50% de resposta da variável. O limite superior da curva (b) corresponde à resposta média da testemunha e o limite inferior (a) é a resposta média com doses elevadas do herbicida.

Para determinar quando a resposta dos biótipos ao herbicida variou significativamente foi utilizado o teste de paralelismo (SCHABENBERGER et al., 1999), possibilitando a comparação dos valores paramétricos entre as curvas de dose-resposta. Este teste ajusta para dois tipos de modelo; um é considerado o modelo geral e apresenta mais parâmetros, e o outro é considerado o modelo reduzido e inclui menos parâmetros que o modelo anterior. Desta forma, o teste F foi calculado pela seguinte fórmula (eq. 5):

$$F = \frac{SQ_r^{II} - SQ_r^I / GL_r^{II} - GL_r^I}{SQ_r^I / GL_r^I} \quad (5)$$

onde SQ_r e GL_r representam a soma dos quadrados e graus de liberdade do resíduo, respectivamente, dos modelos geral (I) e reduzido (II).

Em função da existência dos dados de EC ou FFr , relacionados aos EF e D , foi possível obter a flutuação dos valores de GR_{50} no decorrer das interpolações dos EF . De posse da flutuação de GR_{50} dos dois biótipos e considerando-se fator de resistência (FR) como a relação entre o $GR_{50resistente}/GR_{50susceptível}$, tornou-se viável aceitar ou rejeitar a hipótese de constância do FR nos diferentes EF dos biótipos, para o herbicida de interesse.

4.2.3.1.2 Modelagem tridimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida

A relação entre as doses de um herbicida e as respostas das plantas é de fundamental importância para o entendimento de diversos aspectos relacionados com a seletividade e eficácia

dos herbicidas. O desenvolvimento do modelo matemático, dos dados, trinários envolveu uma variável resposta trinária, denotada por z (variável dependente), e duas covariáveis que denotou-se por x (doses do herbicida) e y (estádios fenológicos). A estimação do modelo e dos parâmetros estatísticos foi obtida empregando-se o programa estatístico especializado no desenvolvimento de regressões em sistema cartesiano tridimensional *Table Curve* (ambiente Windows).

O sistema realiza a estimação dos modelos matemáticos através do método de Levenberg-Marquardt, descrito por Dennis (1963), e utiliza para a construção do teste sobre o modelo a análise da variância do modelo não-linear de regressão com aplicação do teste F ao nível de 5% de probabilidade. Para a estimação dos parâmetros, o software utiliza um procedimento iterativo, ou seja, realiza a estimação através da técnica de ajustamento, iniciando com a estimação do primeiro parâmetro e prosseguindo até que as estimativas sucessivas da soma de quadrados dos desvios (SQS) convergem para um dado valor mínimo, que não mais se modifica dentro de um padrão lógico de precisão, segundo a descrição de Dennis (1963). Este sistema utiliza o teste t-Student, a 5% de probabilidade, para avaliar a acurácia dos parâmetros do modelo. Posteriormente, a descrição das estimações e a construção dos testes sobre os parâmetros e sobre os modelos, interessou saber como ligar esses procedimentos inferenciais com vista a encontrar o modelo que descreveria os dados observados com maior acurácia, isto é, um modelo reduzido que inclua as covariáveis mais importantes para a explicação da resposta da variável dependente.

4.2.3.2 Modelo proposto para estudos de dose-resposta ao herbicida

Os modelos matemáticos usados em matologia pretendem, geralmente, descrever o efeito tóxico de um herbicida na morte das plantas em estudo. Este caso envolve uma covariável contínua e uma variável resposta binária, e a relação entre elas é freqüentemente denominada de modelo de dose-resposta. O modelo matemático de predição do controle das plantas daninhas pelos herbicidas foi proposto com a finalidade de representar os aspectos biológicos intrínsecos a este tipo de relação.

Para o desenvolvimento do modelo proposto, o primeiro passo foi à concepção de uma estrutura baseada em considerações teóricas inerentes ao desenvolvimento da planta daninha *L. multiflorum* quando submetida à aplicação de doses do herbicida; considerando-se os fatores biológicos referentes ao processo de resposta da variável dependente ao herbicida durante o ciclo de desenvolvimento da planta daninha *L. multiflorum*.

Desta forma, assumiu-se que no instante da aplicação da dose nula ($x = 0$) do herbicida, a variável resposta controle de plantas daninhas é nula ($Z = 0$). O mesmo raciocínio é aplicado no caso do controle total da variável resposta ($Z = 100$), então a dose do herbicida pode ser considerada infinita ($x = \infty$). Assim, essa premissa é válida para o estudo da variável resposta fitomassa fresca relativa à testemunha ou eficácia de controle, quanto à aplicação do herbicida.

No intuito de propor uma equação que atenda as condições pré-estabelecidas à cima, obteve-se a seguinte estrutura do modelo matemático que expressa a relação entre a resposta Z à dose x do herbicida (eq. 6) e y é representado pela equação (7):

$$Z = 100 - y \quad (6)$$

$$y = \frac{100}{\left[1 + (ax)^b\right]^c} \quad (7)$$

em que Z representa *FFr* ou *EC* em percentagem de controle, na dose do herbicida x , y representa a porcentagem de plantas não controladas (sobreviventes) e a , b , c são parâmetros empíricos do modelo não-linear proposto para estimar a variável resposta que proporcionam um ajuste biológico apropriado aos dados. Na figura 4.1 foram representados os eixos x , y e Z , demonstrando a relação inversa entre y e Z .

Para generalizar o modelo proposto, introduziram-se os coeficientes empíricos b e c , os quais correspondem aos fatores de forma da curva de dose-resposta (sigmoidal), podendo ser interpretado como o valor numérico que integra as inter-relações não controladas e não consideradas no processo, no intuito de extrapolar o resultado para outras condições de desenvolvimento do experimento.

Os coeficientes foram determinados através da análise de regressão não-linear, utilizando o método dos mínimos quadrados (minimização da soma dos quadrados dos desvios entre os valores observados e estimados) e o procedimento iterativo. Assim como, o teste t-Student, a 5% de probabilidade, para avaliar a acurácia dos parâmetros do modelo, como descrito no item 4.2.3.1.2.

A análise estatística referente a acurácia do modelo foi realizada utilizando o programa computacional *Table Curve* (ambiente Windows), tendo-se como critérios o valor F, o coeficiente de correlação e a premissa de desempenho biológico.

Figura 4.1 - Curvas dose-resposta representativa da equação $Z = 100 - y$ e $y = 100/((1+(ax)^b)^c)$. Eixo x representa dose do herbicida, eixo y representa porcentagem de plantas não controladas (sobreviventes) e eixo Z representa porcentagem de plantas controladas.

A realização do cálculo matemático permitiu a estimação do valor de x que proporciona 50% de resposta em Z , GR_{50} , pela inversão do modelo proposto, deixando-o em função de Z (eq. 8), segundo metodologia proposta por Carvalho et al. (2005):

$$x = \frac{1}{a} \sqrt[b]{\sqrt[c]{\left(\frac{100}{100-Z}\right)}} - 1 \quad (8)$$

A avaliação do ajuste do modelo proposto no presente trabalho aos dados observados foi realizada através da análise comparativa entre a $FFro$ (valores observados de FFr) e a $FFre$ (valores estimados de FFr), tendo as seguintes hipóteses a serem testadas: $a = 0$, $b = 1$ e $r = 1$, quando comparados através de uma regressão linear (análise de comparação) (eq. 9):

$$FFre = A + B.FFr \quad (9)$$

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Modelagem dos estudos de dose-resposta ao herbicida

A aplicação do teste F sobre a análise da variância indicou a significância (0,01%) das variáveis dependentes, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) e eficácia de controle (EC), relacionadas aos biótipos, às doses do herbicida glyphosate (D), aos estádios fenológicos (EF) e, às interações destas variáveis independentes. A significância da interação indica que os biótipos apresentam comportamento diferente entre si entre pelo menos uma D e um EF . A variável dependente FFr ($QMres = 63,90$) foi a mais adequada para a elaboração dos modelos matemáticos de predição em comparação com a variável dependente EC ($QMres = 109,97$), devido ao menor $QMres$ obtido.

4.3.1.1 Modelagem bidimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida

Na tabela 4.2 estão apresentados os parâmetros do modelo log-logístico proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995), ajustados para cada biótipo e para cada *EF*, quando submetidos às *D* crescentes de glyphosate. Estes parâmetros foram utilizados na elaboração da Figura 4.2, nesta verifica-se que no biótipo S o comportamento da curva de dose-resposta entre os *EF* é mantido, de forma crescente, até o BBCH 51; no entanto no biótipo R verifica-se que o BBCH 51 apresenta um comportamento de curva diferente dos demais *EF*, devido possivelmente aos efeitos fisiológicos decorrente do tratamento com glyphosate, relatados no capítulo 2, que conferem resistência a este biótipo, visto que neste estágio a relação entre os tecidos fonte e dreno é modificada, ou seja, as flores representam o tecido com maior fonte de dreno na planta. O teste F, que verifica a precisão dos ajustes paralelos e não paralelos demonstrou que os biótipos R e S apresentam as curvas de dose-resposta não paralelas entre si, para cada *EF*, ao nível de 1% de probabilidade. Desta forma, conclui-se que as curvas não se interceptaram.

Tabela 4.2 - Parâmetros do modelo log-logístico¹, coeficiente de determinação (R^2), redução de 50 % de desenvolvimento (GR_{50}) e fator de resistência (FR) obtidos para a variável dependente fitomassa fresca relativa à testemunha em função das variáveis independentes dose do herbicida e estágio fenológico, para cada biótipo de *Lolium multiflorum*

Estádio Fenológico	Parâmetros					
Biótipos	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	R^2	GR_{50}	FR
BBCH 13-14						
R	0,32 (2,86)	100,62* (5,12)	3,43* (0,58)	0,97	266,56* (15,59)	3,44
S	-0,64 (1,76)	96,99* (4,89)	1,94* (0,24)	0,98	77,51* (7,15)	
BBCH 22-23						
R	-2,03 (2,46)	97,40* (3,98)	1,91* (0,19)	0,99	333,37* (19,63)	2,50
S	-1,58 (2,00)	99,68* (4,27)	1,47* (0,15)	0,99	133,42* (10,47)	
BBCH 51						
R	10,05 (5,30)	93,36* (8,12)	3,07* (0,84)	0,93	422,36* (45,34)	1,73
S	-11,22 (6,96)	111,21* (9,30)	0,85* (0,13)	0,97	243,40* (46,24)	
BBCH 67						
R	8,48* (3,77)	94,27* (5,58)	2,91* (0,56)	0,97	491,51* (34,78)	2,57
S	-1,77 (4,91)	105,04* (7,85)	1,06* (0,16)	0,97	191,45* (28,24)	

¹ Modelo proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995): y [redução da fitomassa fresca relativa à testemunha (%)] = $a + \{(b - a)/[1 + (x/GR_{50})^c]\}$. * Significativo ao teste t-Student, a 5% de probabilidade.

Na Figura 4.3, pode-se observar que os valores de GR_{50} obtidos para o biótipo R aumentaram suavemente entre os EF, respectivamente 25%, 58% e 84% em relação ao primeiro EF. Enquanto que o GR_{50} do biótipo S aumentou bruscamente, respectivamente 72%, 214% e 147%; do BBCH 51 para o BBCH 67 ocorreu uma redução de 21% no valor de GR_{50} no biótipo S (Tabela 4.2). Estas alterações tiveram implicações diretas no FR, que foi reduzido a 73%, 51% e 75% em cada intervalo entre os EF, o que pode estar correlacionado com as características intrínsecas de baixa resistência do biótipo R, bem como do mecanismo fisiológico de resistência comprovado no capítulo 2 (Figura 4.3). Neste caso, os dados puderam ser ajustados a um modelo de regressão polinomial de terceira ordem ($GR_{50}R/S = -0,0148Np^3 + 0,2986Np^2 - 1,7758Np + 3,439$; $R^2 = 1,0$), rejeitando-se a hipótese de constância do FR nos diferentes EF dos biótipos, para o herbicida de interesse. Sendo assim, a modelagem tridimensional dos estudos de dose-resposta representa uma ferramenta essencial para a otimização do processo de elucidação do comportamento do FR com o desenvolvimento das plantas.

Figura 4.2 - Valores percentuais de controle, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr), aos 21 DAA de glyphosate (D , g e.a ha⁻¹), nos quatro estádios fenológicos (BBCH) dos biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível (A) e resistente (B) ao glyphosate. Símbolos e linhas representam os valores obtidos e estimados segundo modelo proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995). Barras verticais representam $\pm$ desvio padrão da média

Figura 4.3 - (A) Valores de redução de 50% do crescimento (GR_{50}) após a aplicação de glyphosate (D , g e.a ha^{-1}) nos biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível (S) e resistente (R) ao glyphosate em função dos estádios fenológicos (Np , número de perfilhos). (B) Valores do fator de resistência (FR) entre os biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível e resistente ao glyphosate em função dos estádios fenológicos (Np , número de perfilhos). Símbolos e linhas representam os valores estimados, respectivamente, segundo modelo proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e segundo regressões comparativas

4.3.1.2 Modelagem tridimensional dos estudos de dose-resposta ao herbicida

Na Figura 4.4 está apresentada a distribuição dos dados observados para confecção do modelo matemático de predição que integra os dados obtidos nos experimentos de dose-resposta em função de duas variáveis independentes (D e EF).

Figura 4.4 - Distribuição dos valores percentuais de controle obtidos, fitomassa fresca relativa à testemunha obtida ($FFro$), aos 21 DAA de glyphosate (D , g e.a ha^{-1}) nos quatro estádios fenológicos (Np , número de perfilhos), dos biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível (A) e resistente (B) ao glyphosate

O modelo de regressão não-linear Lorenziano apresentou adequada aderência aos dados observados em relação a *FFr*, em cada biótipo, para as *D* e os *EF* como descrito nos dados estimados na Figura 4.5 e na Tabela 4.3, através do teste F (eq. 9):

$$z = \frac{a}{\left\{1 + \left[\frac{(x-b)}{c}\right]^2\right\} \times \left\{1 + \left[\frac{(y-d)}{c}\right]^2\right\}} \quad (9)$$

onde *z* representa a *FFr* (%) estimada na *D* (*x*); *y* é o *EF* representado por número de perfilhos (*Np*) e *a*, *b*, *c* e *d* são parâmetros empíricos.

Tabela 4.3 - Parâmetros do modelo tridimensional¹, valor do teste t-Student, intervalo de confiança (I.C., 5%), obtidos para a variável dependente fitomassa fresca relativa à testemunha em função das variáveis independentes dose do herbicida e estágio fenológico, para os biótipos de *Lolium multiflorum* resistente (R) e susceptível (S)

Biótipos	Parâmetros	Valor Obs ²	Valor-t	I.C. (5%) Limite		F ³
				Inferior	Superior	
R	<i>a</i>	200,23	0,00	-153998,95	154399,43	195,45*
	<i>b</i>	59,66	2,34	8,66	110,67	
	<i>c</i>	323,92	9,30	254,30	393,54	
	<i>d</i>	329,02	0,00	-249143,26	249801,31	
S	<i>a</i>	3453,03	0,08	-85741,55	92647,62	190,174*
	<i>b</i>	-309,64	-4,75	-439,99	-179,28	
	<i>c</i>	72,91	0,47	-240,06	385,87	
	<i>d</i>	71,24	0,05	-2724,24	2866,72	

¹ Modelo tridimensional proposto: $z = a / \{ [1 + [(x-b)/c]^2] \cdot [1 + [(y-d)/c]^2] \}$. ² Valor observado. ³ Teste F sobre a análise da variância. * Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade

As equações ajustaram-se, individualmente para cada biótipo, de forma precisa, pois foram observados os valores de R^2 próximos a um, explicando 90% e 89% da variabilidade dos dados entre as diversas *D* e *EF*, respectivamente nos biótipos R e S. Na tabela 4.3 estão apresentados os parâmetros do modelo tridimensional de dose-resposta, ajustados para cada biótipo quando submetidos às *D* crescentes do glyphosate. Estes parâmetros foram utilizados na elaboração da Figura 4.5, nesta verifica-se que no biótipo S o comportamento de superfície de resposta entre os *EF* decresce bruscamente na dose de 500 g e.a ha⁻¹ de glyphosate, enquanto que este decréscimo somente ocorreu na dose de 1500 g e.a. ha⁻¹ no biótipo R, comprovando a distribuição dos dados observados na Figura 4.4 e sendo este um dos fatores que justificaram eleger esta equação para representar a resposta da variável *FFr* em relação à *D* e aos *EF*. Outro aspecto relevante foi que

este decréscimo não ocorre uniformemente entre os biótipos sendo, de certa forma, mais suave com o desenvolvimento da planta, devido à tolerância comparativa em função dos *EF*. Estes dois aspectos foram os principais considerados no momento de escolha da equação 9 para estimar os dados obtidos, visto que são os aspectos biológicos mais relevantes com relação ao desenvolvimento da planta segundo Vidal e Merotto (2001).

4.3.2 Modelo proposto para estudos de dose-resposta ao herbicida

A aplicação do teste F sobre a análise da variância indicou que o modelo proposto neste trabalho foi o mais adequado para os estudos de dose-resposta da variável dependente (*FFr*), relacionada aos biótipos, às doses do herbicida glyphosate (*D*) e aos estádios fenológicos (*EF*). Na Tabela 4.4 demonstra-se que o modelo proposto foi o mais adequado, menor quadrado médio do resíduo, em comparação com os principais modelos empregados nos estudos de dose-resposta que foram propostos por Streibig (1988), modelo logístico, e por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995), modelo log-logístico.

Tabela 4.4 - Quadrado Médio do resíduo (QMres) dos modelos matemáticos estudados obtidos para a variável dependente fitomassa fresca relativa à testemunha em função das variáveis independentes dose do herbicida e estágio fenológico, para cada biótipo de *Lolium multiflorum*

Estádios Fenológicos	QMres dos Modelos Matemáticos		
	Streibig (1988)	Seefeldt et al. (1995)	Proposto
Biótipo Susceptível			
BBCH 13-14	19,19645	20,549501	11,38816*
BBCH 22-23	12,822427	13,139444	9,7073109*
BBCH 51	27,489275	21,873608	9,7073015*
BBCH 67	25,401459	27,2211739	18,483657*
Biótipo Resistente			
BBCH 13-14	41,92527*	45,370149	42,069853
BBCH 22-23	14,853383	15,158674	11,839419*
BBCH 51	118,85234	107,97285	60,638704*
BBCH 67	56,202528	46,420827	17,710562*

* Menor QMres obtido na análise da variância.

Na tabela 4.5 estão apresentados os parâmetros do modelo proposto neste trabalho, ajustados para cada biótipo e para cada *EF*, quando submetidos às *D* crescentes de glyphosate. Estes parâmetros foram utilizados na elaboração da Figura 4.6, nesta verifica-se que no biótipo S o comportamento da curva de dose-resposta entre os *EF* é mantido, de forma crescente, até o BBCH 67, assim como no biótipo R; no entanto no biótipo S o padrão de curva dose-resposta

entre os *EF* cresce bruscamente, enquanto que este acréscimo ocorre mais suavemente no biótipo R. Este aspecto é comprovado na Tabela 4.5, visto que, os valores de GR_{50} obtidos para o biótipo R aumentaram suavemente entre os *EF*, respectivamente 27%, 80% e 100% em relação ao primeiro *EF*. Enquanto que o GR_{50} do biótipo S aumentou bruscamente, respectivamente 70%, 70% e 160%; do BBCH 51 para o BBCH 67 o valor de GR_{50} no biótipo S manteve-se constante (Tabela 4.5). Estas alterações tiveram implicações diretas no *FR*, que foi reduzido a 31%, 2% e 29% em cada intervalo entre os *EF*, o que pode estar correlacionado com as características intrínsecas de baixa resistência do biótipo R, bem como do mecanismo fisiológico de resistência comprovado no capítulo 2 (Tabela 4.5). Do BBCH 22-23 para o BBCH 51 ocorreu um aumento de 41% no *FR*, semelhante ao *FR* observado no BBCH 13-14, possivelmente devido à correlação direta entre o mecanismo de resistência e a troca dos tecidos fonte e dreno, que ocorre principalmente no BBCH 51 (Figura 4.6).

A relação entre os dados observados e os estimados pelo modelo proposto é apresentada esquematicamente através de uma análise de comparação com os modelos de Streibig (1988) e de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) nos biótipos S (Figuras 4.7 a 4.10) e R (Figuras 4.11 a 4.14).

No biótipo S, o modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) subestima em 2%, 0,65% e 2,5% o valor estimado em relação ao observado, respectivamente, no BBCH 13-14, BBCH 22-23 e BBCH 51; enquanto no BBCH 67 superestima em 0,57%. O modelo de Streibig (1988) subestima em 1,3%, 0,69% e 4,5% o valor estimado em relação ao observado, respectivamente, no BBCH 13-14, BBCH 22-23 e BBCH 51; enquanto no BBCH 67 superestima em 0,23%. O modelo proposto superestima 0,07%, 0,44% e 2,9% o valor estimado em relação ao observado, respectivamente, no BBCH 13-14, BBCH 22-23 e BBCH 51; enquanto no BBCH 67 subestima em 1,15%. Desta forma, constata-se que o modelo proposto em média, em relação aos *EF*, apresenta os valores estimados mais próximo dos valores observados ($B \sim 1$). No BBCH 13-14 o modelo proposto é 0,3% subestimado em relação ao modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995), enquanto é 1,07% superestimado em relação ao modelo de Streibig (1988). No BBCH 22-23 o modelo proposto é 0,14% superestimado em ambos os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988). No BBCH 51 o modelo proposto é 16,7% e 15,1% subestimado em relação ao modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988), respectivamente. No BBCH 67 o modelo proposto é 1,7% e 1,4% subestimado em relação ao modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988), respectivamente. Desta forma, o modelo proposto

Figura 4.5 - Três ângulos de visão das superfícies de resposta estimada em relação aos valores percentuais de controle, fitomassa fresca relativa (FFr), aos 21 DAA de glyphosate (D , g e.a ha⁻¹) nos quatro estádios fenológicos (0, 3, 7 e 11 número de perfis, N_p) dos biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível (A, B e C) e resistente (D, E e F) ao glyphosate. Símbolos representam os valores obtidos e barras verticais representam $\pm$ desvio padrão da média

representa com maior acurácia a situação de dose-resposta para as plantas nos *EF* iniciais (BBCH 13-14 e BBCH 22-23).

No biótipo R, o modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) superestimam, ambos, em 0,18% o valor estimado em relação ao observado no BBCH 13-14; enquanto no BBCH 22-23 e BBCH 51 superestimam em 0,43% e 2,63%, respectivamente no modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995), e 0,44% e 2,62%, respectivamente no modelo de Streibig (1988). No BBCH 67 o modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) subestima em 4,9% e o modelo de Streibig (1988) superestima em 0,23% o valor estimado em relação ao observado. O modelo proposto subestima 0,60%, 2,17% e 2,88% o valor estimado em relação ao observado, respectivamente, no BBCH 13-14, BBCH 51 e BBCH 67; enquanto no BBCH 22-23 superestima em 0,28%. Desta forma, constata-se que o modelo proposto em média, em relação aos *EF*, apresenta os valores estimados mais próximo dos valores observados ($B \sim 1$). No BBCH 13-14 o modelo proposto é 0,7% subestimado em ambos modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988). No BBCH 22-23 o modelo proposto é 0,7% superestimado em ambos os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988). No BBCH 51 o modelo proposto é 0,17% e 0,51% subestimado em relação ao modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988), respectivamente. No BBCH 67 o modelo proposto é 1,4% e 0,7% superestimado em relação ao modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988), respectivamente. Desta forma, o modelo proposto representa com maior acurácia a situação de dose-resposta para as plantas em nos *EF* iniciais (BBCH 13-14, BBCH 22-23 e BBCH 51).

Neste caso, os dados de *FR* puderam ser ajustados a um modelo de regressão comparativo polinomial de terceira ordem. O modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) pode ser representado por $FR = -0,0148Np^3 + 0,2986Np^2 - 1,7758Np + 3,439$ ($R^2 = 1,0$); o modelo de Streibig (1988) pode ser representado por $FR = -0,0025Np^3 + 0,0704Np^2 - 0,517Np + 3,4594$ ($R^2 = 1,0$) e o modelo proposto por $FR = -0,0136Np^3 + 0,2235Np^2 - 0,9085Np + 3,516$ ($R^2 = 1,0$), rejeitando-se a hipótese de constância do *FR* nos diferentes *EF* dos biótipos, para o herbicida de interesse, nos modelos estudados e no proposto.

Tabela 4.5 - Parâmetros do modelo proposto¹, valor do teste de t-Student, Intervalo de confiança (I.C., 5%), valor do teste de F, coeficiente de determinação (R^2), redução de 50 % de desenvolvimento (GR_{50}) e fator de resistência (FR) obtidos para a variável dependente fitomassa fresca relativa à testemunha em função das variáveis independentes dose do herbicida e estágio fenológico, para cada biótipo de *Lolium multiflorum* resistente (R) e susceptível (S) ao glyphosate

Estádio Fenológico		Parâmetros	Valor Estimado	Valor-t	I.C. (5%) Limite		F	R ²	GR ₅₀	FR
Biótipos					Inferior ²	Superior ²				
BBCH 13-14	R	a	0,00	2,19	> 0,00	> 0,00	324,232 ^{**}	0,97	270,63	3,52
		b	3,30	2,90	0,84	5,77				
		c	1,15	0,99	> 0,00	3,67				
	S	a	0,00	0,09	> 0,00	0,01	612,759 ^{**}	0,99	76,97	
		b	1,21	4,59 [*]	0,64	1,77				
		c	31,70	0,08	> 0,00	857,20				
BBCH 22-23	R	a	0,00	0,26	> 0,00	> 0,00	861,316 ^{**}	0,99	318,28	2,44
		b	1,26	7,06 [*]	0,87	1,65				
		c	14,24	0,23	> 0,00	147,87				
	S	a	0,00	0,77	> 0,00	> 0,00	798,858 ^{**}	0,99	130,68	
		b	1,09	6,61 [*]	0,73	1,44				
		c	3,75	0,94	> 0,00	12,37				
BBCH 51	R	a	0,00	8,12 [*]	> 0,00	> 0,00	202,100 ^{**}	0,96	451,23	3,45
		b	41,17	0,00	> 0,00	13005,28				
		c	0,03	0,00	> 0,00	9,23				
	S	a	0,00	0,77	> 0,00	> 0,00	798,859 ^{**}	0,99	130,68	
		b	1,09	6,61 [*]	0,73	1,45				
		c	3,75	0,94	> 0,00	12,37				
BBCH 67	R	a	0,00	15,48 [*]	> 0,00	> 0,00	682,445 ^{**}	0,99	500,39	2,50
		b	63,00	0,02	> 0,00	5458,98				
		c	0,02	0,02	> 0,00	1,56				
	S	a	0,00	1,94	> 0,00	0,01	396,115 ^{**}	0,98	200,08	
		b	1,29	4,19 [*]	0,62	1,95				
		c	0,72	2,15	> 0,00	1,44				

¹ Modelo proposto: $Z = 100 - \{100/[1+(ax)^b]^c\}$. ² Assunções para obtenção do modelo, parâmetros 0,0. * Significativo a 1% de probabilidade para o teste t-Student a 5% de probabilidade. ** Significativo a 5% de probabilidade para o teste F.

Figura 4.6 - Valores percentuais de controle, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr), aos 21 DAA de glyphosate (D , g e.a. ha^{-1}) nos quatro estádios fenológicos BBCH 13-14 (A), BBCH 22-23 (B), BBCH 51 (C) e BBCH 67 (D), dos biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível (S) e resistente (R) ao glyphosate. Símbolos e linhas representam os valores observados e estimados segundo modelo proposto

Figura 4.7 - *Lolium multiflorum* susceptível, BBCH 13-14. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D, g e.a ha⁻¹). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada (FFro, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada (FFre, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. FFrese (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); FFrest (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; FFrep (%), segundo modelo proposto

Figura 4.8 - *Lolium multiflorum* susceptível, BBCH 22-23. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D , g e.a ha^{-1}). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada ($FFro$, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada ($FFre$, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. $FFre$ (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); $FFrest$ (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; $FFrep$ (%), segundo modelo proposto

Figura 4.9 - *Lolium multiflorum* susceptível, BBCH 51. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D, g e.a ha⁻¹). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada (FFro, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada (FFre, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. FFse (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); FFrest (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; FFrep (%), segundo modelo proposto

Figura 4.10 - *Lolium multiflorum* susceptível, BBCH 67. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D , g e.a ha^{-1}). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada ($FFro$, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada ($FFre$, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. $FFre$ (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); $FFrest$ (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; $FFrep$ (%), segundo modelo proposto

Figura 4.11 - *Lolium multiflorum* resistente, BBCH 13-14. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D, g e.a ha⁻¹). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada (FFro, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada (FFre, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. FFrese (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); FFrest (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; FFrep (%), segundo modelo proposto

Figura 4.12 - *Lolium multiflorum* resistente, BBCH 22-23. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D, g e.a ha⁻¹). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada (FFro, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada (FFre, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. FFrese (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); FFrest (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; FFrep (%), segundo modelo proposto

Figura 4.13 - *Lolium multiflorum* resistente, BBCH 51. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D, g e.a ha⁻¹). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada (FFro, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada (FFre, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. FFrese (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); FFrest (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; FFrep (%), segundo modelo proposto

Figura 4.14 - *Lolium multiflorum* resistente, BBCH 67. A, B e C, fitomassa fresca relativa à testemunha (FFr) em função da dose (D, g e.a ha⁻¹). D, E e F, fitomassa fresca relativa à testemunha observada (FFro, %) em função da fitomassa fresca relativa à testemunha estimada (FFre, %) para cada modelo matemático. G e H, fitomassa fresca relativa estimada para os modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995) e de Streibig (1988) comparativamente ao modelo proposto. FFrese (%), valores estimados segundo modelo de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); FFrest (%), segundo modelo de Streibig (1988) e; FFrep (%), segundo modelo proposto

Figura 4.15 - A, B e C, valores de redução de 50% do crescimento (GR_{50}) 21 DAA de glyphosate (D , g e.a ha^{-1}), nos biótipos de *Lolium multiflorum* susceptível (S) e resistente (R) ao glyphosate em função dos estádios fenológicos (Np , número de perfilhos). D, E e F, valores do fator de resistência (FR) entre os biótipos de *Lolium multiflorum* em função dos estádios fenológicos (Np , número de perfilhos). A e D, modelos de Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995); B e E, modelo de Streibig (1988) e; C e F, modelo proposto

4.4 Conclusões

Os modelos matemáticos propostos neste trabalho, tridimensional e bidimensional, representam os aspectos biológicos intrínsecos aos estudos de dose-resposta, assim como permitem constatar que o fator de resistência na planta daninha *L. multiflorum* não tem ajuste linear, não sendo, portanto, constante.

Conclui-se que a utilização do modelo matemático proposto de regressão não-linear representa uma abordagem com rigor científico, que permite integrar toda a informação biológica disponível, e que com esse modelo matemático as agências reguladoras possuem uma base científica para escolher entre diferentes opções de manejo. Nas situações de suspeita de resistência em uma propriedade, a modelagem é a única alternativa possível para fornecer projeções com base científica, sobre o processo de resistência e os riscos associados ao mesmo.

Referências

ASOCIATION LATINO AMERICANA DE MALEZAS – ALAM. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v. 1, p. 35-38, 1974.

CARVALHO, S.J.P.; LOMBARDI, B.P.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n.3, p.535-542, 2005.

CHIACCHIO, E.J. **Regressão não-linear: desenvolvimento de um sistema computacional e aplicações**. 1993. 149 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.

DENNIS, J.R. Some computational techniques for the nonlinear least square problem. In: BYRNE, G.D.; HALL, C.A. (Ed.). **Numerical solution of systems of nonlinear equations**. New York: Academic Press, 1973.

De WIT, C.T. **Simulation for assimilation, respiration, and transpiration of crops**. Wageningen: A Halsted Press Book, 1978. 140 p.

GARCÍA Y GARCÍA, A. **Modelos para área foliar, fiomassa e extração de nutrientes na cultura do arroz**. 2002. 90 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 565-571, 1998.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extendend BBCH escale – general for descriptions of the growth stages of mono-and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 433-441, 1997.

MAIA, A. H. N. **Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas**: qualificação de risco utilizando análise de incertezas. 2003. 108 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MOTULSKY, H.J.; RANSNAS, L.A. Fitting curves to data using non-linear regression. A practical and nonmathematical review. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 1, p. 365-374, 1987.

SCHABENBERGER, O.; THARP, B.E.; KELLS, J.J.; PENNER, D. Statistical test for hormesis and effective dosages in herbicide dose-response. **Agronomy Journal**, Madison, v. 91, n. 5, p. 713-721, 1999.

SEBER, G.A.F.; WILD, C.J. Nonlinear regression. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1989. 768 p.

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

STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 479-484, 1988.

VIDAL, R.A.; MEROTTO, A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: _____. (Ed.). **Herbicidologia**. Porto Alegre. 2001. p. 138-148.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvida esta pesquisa, foi possível concluir que:

(a) Os testes de dose-resposta em placas de Petri e em vasos, assim como os testes de acúmulo de ácido shiquímico e de taxa de assimilação líquida de CO₂ identificam os biótipos de *L. multiflorum* e de *L. rigidum* resistentes ao herbicida glyphosate, sendo, portanto, metodologias efetivas para a detecção de biótipos de *Lolium* spp. resistentes a este herbicida.

(b) Os testes de dose-resposta em placas de Petri e em vasos, de acúmulo de ácido shiquímico e de comportamento da fotossíntese líquida, diferem em relação ao tempo, aos custos e aos equipamentos necessários para condução dos mesmos. Sendo os testes de dose-resposta em placas de Petri e em vasos o mais econômico e que necessita de maior tempo para execução do mesmo. Os testes de quantificação de ácido shiquímico e da taxa de fotossíntese são mais rápidos e com maior custo de execução.

(c) A planta daninha *L. multiflorum* apresenta como provável mecanismo de resistência a maior translocação do herbicida glyphosate, devido ao fato de não ocorrer à auto-inibição do transporte deste herbicida pelo floema.

(d) O herbicida glyphosate não afeta as variáveis fotossíntese líquida e taxa interna/externa de CO₂, assim como inibe a transpiração e incrementa a eficiência do uso da água, devido ao mecanismo de resistência que não inibide a assimilação do carbono.

(e) A distribuição dos tricomas em pares no biótipo resistente não resultou em diferença na absorção do herbicida glyphosate.

(f) O baixo nível de acúmulo de ácido shiquímico, no biótipo resistente, indica que o herbicida glyphosate não é totalmente inibido de atuar em seu sítio de ação. Desta forma, a resistência da planta daninha *L. multiflorum* ao glyphosate, provavelmente, não é atribuída a um único mecanismo de resistência.

(g) Estudos relacionados à expressão e a sensibilidade da EPSPs são necessários para elucidar a possibilidade de outros mecanismos de resistência.

(h) A equação $z = \{1+[(x-b)/c]^2\} \cdot \{1+[(x-b)/c]^2\}$ foi adequada para ajustar a relação entre a fitomassa fresca relativa à testemunha (variável dependente) e as variáveis independentes (doses do herbicida e estádios fenológicos).

(i) A equação $GR_{50}^{susceptível}/GR_{50}^{resistente} = -0,0148Np^3 + 0,2986Np^2 - 1,7758Np + 3,439$ foi adequada para representar o comportamento não-linear do fator de resistência.

(j) A equação proposta para estudos de dose-resposta, $Z = 100 - \{100/[1+(ax)^b]^c\}$, foi adequada para ajustar a relação entre a fitomassa fresca relativa à testemunha e as doses do herbicida, nos estádios de desenvolvimento da planta daninha *L. multiflorum*.

(k) O modelo proposto proporciona um ajuste biológico apropriado aos dados.