RESISTÊNCIA DE *Bidens pilosa* L. AOS HERBICIDAS
INIBIDORES DA ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE

JOÃO ADOLFO DE REZENDE PONCHIO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Victoria Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti

Tese apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz
de Queiroz”, da Universidade
de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em
Agronomia. Área de
Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Ponchio, João Adolfo de Rezende

Resistência de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. - - Piracicaba, 1997.

139 p.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Herbicida 2. Manejo 3. Picão preto 4. Planta daninha 5. Resistência ao herbicida I. Título

CDD 632.58

RESISTÊNCIA DE *Bidens pilosa* L. AOS HERBICIDAS
INIBIDORES DA ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE

JOÃO ADOLFO DE REZENDE PONCHIO

Aprovada em: 16.05.1997

Comissão julgadora :

Prof. Dr. Ricardo Victoria Filho

ESALQ/USP

Prof. Dr. Murilo de Melo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro

ESALQ/USP

Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli

FCAV/UNESP

Prof. Dr. Adelino Pelissari

UFPR

Prof. Dr. Ricardo Victoria Filho

Orientador

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas e entidades que tornaram possível este trabalho. Diante da impossibilidade de reunir a todas com um grande abraço, registro abaixo os meus agradecimentos. A todos que, de forma direta ou indireta colaboraram neste trabalho, meus mais sinceros manifestos de gratidão.

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, casa de excelência, local onde prazerosamente venho estudando há muitos anos e alcançando minha formação.

Ao **Professor Dr. Ricardo Victoria Filho**, Departamento de Horticultura, ESALQ/USP, pela orientação constante e amiga, há quase duas décadas, cuja amizade e compreensão foram sempre imprescindíveis à minha vida acadêmica.

Ao **Professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti**, Departamento de Horticultura, ESALQ/USP, autor de muitas das idéias que compõem este trabalho, companheiro e amigo, meu mais profundo sentimento de gratidão.

Ao **Professor Dr. Murilo de Melo**, Centro de Biotecnologia Agrícola, ESALQ/USP, que de forma pronta ensinou-me as técnicas bioquímicas utilizadas nas análises laboratoriais, mostrando-me outras porções de um mundo fascinante.

Ao **Professor Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias**, Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP, pelo auxílio paciente na análise e elaboração dos resultados.

Aos **Doutores Dale L. Shaner e Bijay K. Singh**, American Cyanamid Company, Princeton, New Jersey, Estados Unidos, pela calorosa acolhida em seu laboratório e transferência de conhecimentos sobre técnicas avançadas de bioquímica.

Ao Banco do Estado de São Paulo S.A., na pessoa do seu então **Diretor de Crédito Rural Nélson Mancini Nicolau**, pela abertura e amizade. Faço votos que, ainda um dia, suas idéias possam ser desenvolvidas e postas em prática.

Ao amigo **Engenheiro Agrônomo Dr. Walter Soboll**, Banespa, pelo exemplo de competência e produtividade, tanto intelectual quanto ao nível de realizações.

À Faculdade de Agronomia “Manoel Carlos Gonçalves”, Espírito Santo do Pinhal, especialmente ao **Professor Engenheiro Agrônomo Mário Alberto Gotô**, Chefe do Departamento de Fitotecnia, amigo de todas as horas, meus mais humildes agradecimentos. Ao **Professor José Aparecido Sartori**, sempre disposto a atender meus pedidos.

À Cyanamid Química do Brasil, saudando o **Engenheiro Agrônomo M.S. Arilton Antonio Frenhani**, Gerente do Centro de Pesquisas Agronômicas, e o **Dr. Donald Gates**, “International Field Manager”, American Cyanamid Company, pela receptividade e compreensão, apoiando-me para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e engenheiros agrônomos do Banespa que por 12 anos conviveram e compartilharam experiências comigo, especialmente os colegas engenheiros agrônomos: **Mário Alberto Gotô, José Brasil Leite Júnior, José Aparecido Raimundo de Almeida, Celso Albano de Carvalho, Luiz Tarciso Sartori, Luiz Antonio Mariano**

Lopes, **Sebastião Rovilson Marques**, **José Vince Júnior**, **Manoel José de Andrade**, **Osmar José Peroni**, **Dario Guerra Filho**, **Marco Antonio Ferraz Cachola** e **Wanderlei Bernardi**. Agradeço, também, a escriturária **Isolete Aparecida da Costa**.

Aos funcionários da ESALQ/USP e principalmente do Departamento de Horticultura, com os quais sempre dividi momentos de trabalho árduo e lazer. Quero agradecer particularmente aos amigos **Luiz Ferrari**, **Aparecido Mendes** e **Ony Rodrigues de Campos**.

Ao funcionário e amigo **Antonio Francisco Campos do Amaral** do CEBTEC\ESALQ\USP companheiro de horas de laboratório, sempre tranquilo e atento às minhas dificuldades, auxiliando-me de imediato.

Aos graduandos que sempre acompanharam com entusiasmo meus trabalhos, meu mais nobre reconhecimento pela dedicação e ajuda. Nominalmente saúdo: **Patrícia A. Monqueiro**, **Ricardo J. Khatchadorian**, **Sílvia M. Fugiwara**, **Sérgio Marcus Ventura Borges Barbosa**, **Luiz Roberto Pimentel Trevisan**, **Iuri Ivan Taffarel**, **Wagner Pestana**, **Roberto Alves Júnior**, **Lucilene Vanessa Andrade**, **Fábio Torrezan Masserotto**, **Sérgio Batista Alves Filho**, **Leopoldo Viriato Saboya** e **Plínio Pulz Lara**.

A Datagricolate Informática Ltda., destacadamente seu proprietário **Guido Sarin Júnior**, pelo trabalhos de editoração eletrônica e elaboração final.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas	4
2.2. Fatores que afetam o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes	7
2.3. Herbicidas inibidores da enzima ALS e resistência.....	13
2.4. Desenvolvimento de culturas resistentes	20
2.5. Estudo da resistência através de curvas de dose-resposta	27
2.6. Prevenção e manejo de áreas com plantas daninhas resistentes ...	29
2.7. A planta daninha <i>Bidens pilosa</i> L.	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Local dos experimentos	36
3.1.1. Fase experimental em casa-de-vegetação	36
3.1.2. Fase experimental em laboratório	37
3.2. Plantas daninhas	37
3.3. Substrato	38

3.4. Avaliação da sensibilidade de cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS, através de curvas de dose-resposta	39
3.4.1. Semeadura e obtenção das plantas	39
3.4.2. Aplicação dos herbicidas	42
3.4.3. Tratamentos	42
3.4.4. Avaliações	45
3.4.5. Análise dos resultados e estabelecimento de curvas de dose-resposta	47
3.5. Ensaios de extração da enzima ALS de cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. e bioensaios “in vitro” para a determinação de sua bioatividade na presença de inibidores	49
3.5.1. Produção do material vegetal	51
3.5.2. Extração da enzima	51
3.5.3. Preparo das diluições dos herbicidas	54
3.5.4. Dessanilização da enzima	56
3.5.5. Bioensaio “in vitro” com a enzima	58
3.5.6. Método simplificado	59
3.5.7. Análise dos resultados e estabelecimento de curvas de dose-resposta para a inibição da enzima	64
3.6. Controle químico alternativo das populações de <i>Bidens pilosa</i> L. resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS.....	66
3.6.1. Semadura e obtenção das plantas	66

3.6.2. Aplicação dos herbicidas	67
3.6.3. Tratamentos	67
3.6.4. Avaliações	71
3.6.5. Delineamento estatístico e análise dos resultados	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. Resultados de casa-de-vegetação – curvas de dose-resposta	74
4.2. Resultados de laboratório	99
4.3. Controle alternativo	108
5. CONCLUSÕES	115
6. BIBLIOGRAFIA	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcha de extração da enzima ALS de cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L.....	53
Figura 2. Roteiro para preparo das diluições dos herbicidas a partir do produto técnico purificado.....	55
Figura 3. Marcha para dessalinização da enzima ALS, tanto pelo método direto quanto para análise de amostras congeladas.....	57
Figura 4. Roteiros para realização de bioensaio “in vitro” com a enzima ALS.....	60
Figura 5. Método de extração da enzima ALS para cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. e bioensaio com diferentes herbicidas.....	65
Figura 6. Dose-resposta para cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida chlorimuron-etil - Produção média de fitomassa verde (g.parcela ⁻¹).....	75
Figura 7. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida metsulfuron-metil - Produção média de fitomassa verde (g.parcela ⁻¹).....	76
Figura 8 . Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida imazethapyr - Produção média de fitomassa verde (g.parcela ⁻¹).	77

Figura 9. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida nicosulfuron - Produção média de fitomassa verde (g.parcela ⁻¹).....	78
Figura 10. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida chlorimuron-etil - Porcentagem média de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.	80
Figura 11. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida metsulfuron-metil - Porcentagem média de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.	81
Figura 12. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida imazethapyr - Porcentagem média de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.	82
Figura 13. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida nicosulfuron - Porcentagem média de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.	83
Figura 14. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida chlorimuron-etil - Produção média de fitomassa seca (g.parcela ⁻¹).....	87
Figura 15. Dose-resposta para cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida metsulfuron-metil - Produção média de fitomassa seca (g.parcela ⁻¹).....	88

Figura 16. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida imazethapyr - Produção média de fitomassa seca (g.parcela ⁻¹).....	89
Figura 17. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida nicosulfuron - Produção média de fitomassa seca (g.parcela-1).....	90
Figura 18. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida chlorimuron-etil - Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.	91
Figura 19. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida metsulfuron-metil - Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.	92
Figura 20. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida imazethapyr - Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.	93
Figura 21. Dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com o herbicida nicosulfuron - Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.....	94
Figura 22. Comportamento das cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L. tratados com as doses de campo dos quatro herbicidas testados. Porcentagem de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.	97

- Figura 23. Comportamento das cinco populações de *Bidens pilosa* L. tratados com as doses de campo dos quatro herbicidas testados. Porcentagem de produção de fitomassa seca em relação à testemunha. 98
- Figura 24. Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (μM) do herbicida imazethapyr. Porcentagem de atividade em relação ao controle. 100
- Figura 25. Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (nM) do herbicida chlorimuron-etil. Porcentagem de atividade em relação ao controle. 101
- Figura 26. Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens Pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (nM) do herbicida pirimidiloxibenzoato (POB). Porcentagem de atividade em relação ao controle. 102
- Figura 27. Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens Pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (nM) do herbicida flumetsulan. Porcentagem de atividade em relação ao controle. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química de macro e alguns micronutrientes presentes nas amostras de terra, húmus e na mistura de terra com húmus, empregadas nos experimentos em casa-de-vegetação.	40
Tabela 2. Análise granulométrica das amostras de terra, húmus e da mistura de terra com húmus, empregadas nos experimentos em casa-de-vegetação.	41
Tabela 3. Tratamentos utilizados para o estabelecimento de curvas de dose-resposta para as cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L.	46
Tabela 4. Tratamentos utilizados para a observação do controle químico de populações de <i>Bidens pilosa</i> L.	72
Tabela 5. Equações de regressão ($x=\text{LnDose}$) para a porcentagem de fitomassa verde em relação à testemunha. Cálculo do GR50 e do efeito da dose correspondente ao tratamento de campo para os quatro herbicidas. ...	85
Tabela 6. Equações de regressão ($x=\text{LnDose}$) para a porcentagem de fitomassa seca em relação à testemunha. Cálculo do GR50 e do efeito da dose correspondente ao tratamento de campo para os quatro herbicidas. ...	95
Tabela 7. Equações de regressão linear e cálculo do I_{50} para os dados dos bioensaios "in vitro" realizados com a enzima ALS extraída de cinco populações de <i>Bidens pilosa</i> L.	106

Tabela 8. Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle da população resistente R1 de <i>Bidens pilosa</i> L..	109
Tabela 9. Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle do biotipo resistente R2 de <i>Bidens pilosa</i> L..	110
Tabela 10. Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle do biotipo resistente R3 de <i>Bidens pilosa</i> L..	111
Tabela 11. Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle do biotipo suscetível S1 de <i>Bidens pilosa</i> L..	112
Tabela 12. Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle do biotipo suscetível S2 de <i>Bidens pilosa</i> L..	113

RESISTÊNCIA DE *Bidens pilosa* L. AOS HERBICIDAS
INIBIDORES DA ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE

Autor : JOÃO ADOLFO DE REZENDE PONCHIO

Orientador : PROF. DR. RICARDO VICTORIA FILHO

Co-orientador : PROF. DR. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI

RESUMO

Sementes de planta daninha *Bidens pilosa* L. resistentes e suscetíveis aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), EC 4.1.3.18, foram coletadas de áreas cultivadas com soja nos Estados do Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Experimentos em casa-de-vegetação e de laboratório foram instalados com o objetivo de avaliar a sensibilidade destas populações aos herbicidas inibidores da ALS através de curvas de dose-resposta, para os dados obtidos de plantas inteiras, e para a enzima ALS, extraída "in vitro". Foram testados, também, outros tratamentos com herbicidas de mecanismos de ação diferentes capazes de controlar esta planta daninha. As curvas de dose-resposta em casa-de-vegetação foram estabelecidas pela aplicação dos herbicidas chlorimuron-etil, metsulfuron-metil, imazethapyr e nicosulfuron. As três populações resistentes sofreram uma redução de 50% no crescimento (GR_{50}) à partir de doses dos herbicidas várias vezes superiores em relação às aplicadas nas populações suscetíveis. A enzima ALS extraída das

populações resistentes foi insensível aos herbicidas chlorimuron-etil, imazethapyr, pirimidiloxibenzoato e flumetsulan. Concentrações dos herbicidas entre 3 e 22 vezes maiores foram necessárias para provocar a mesma inibição, quando comparadas às populações suscetíveis. O controle das populações resistentes foi muito baixo ou nulo com os herbicidas imazethapyr, chlorimuron-etil e flumetsulan nas doses recomendadas. Porém, os herbicidas sulfentrazone, bentazon, lactofen, fomesafen e acifluorfen, sozinhos ou em misturas com herbicidas inibidores da enzima ALS, mostraram controle acima de 95% para todas as populações resistentes. Os resultados permitem concluir que as populações estudadas são resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS. A resistência foi provavelmente provocada por alterações na enzima ALS, tornando-a insensível à inibição causada pelos herbicidas. A resistência é cruzada pois abrange os quatro grupos químicos diferentes testados. O uso de herbicidas com outros mecanismos de ação pode colaborar no manejo da planta daninha *Bidens pilosa* L. retardando ou evitando o aparecimento de populações de plantas daninhas resistentes em áreas agrícolas.

RESISTANCE OF *Bidens pilosa* L. TO ACETOLACTATE
SYNTHASE ENZYME INHIBITOR HERBICIDES

Author : JOÃO ADOLFO DE REZENDE PONCHIO

Adviser : PROF. DR. RICARDO VICTORIA FILHO

Co-adviser : PROF. DR. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI

SUMMARY

Seeds of resistant and susceptible populations of the weed *Bidens pilosa* L. to acetolactate synthase (ALS) enzyme, EC 4.1.3.18, inhibitor herbicides were collected in soybean areas of Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul States, Brazil. Greenhouse and laboratory experiments were carried out with the objective of evaluating populations sensitivity using dose-response curves for whole plants and for extracted ALS enzyme "in vitro". It was tested also other herbicides with different mechanisms of action able to control this weed. Greenhouse dose-response curves were plotted for chlorimuron-ethyl, metsulfuron-methyl, imazethapyr and nicosulfuron herbicides. All resistant populations showed Growth Reduction values (GR_{50}) by rates many times higher than the rates for the susceptible populations. Resistant populations extracted enzymes were insensitive to chlorimuron-ethyl, imazethapyr, pyridyloxybenzoate and flumetsulan. Herbicide concentration needed to inhibit extracted enzyme from resistant populations changed from 3 to 22 times higher

than extracted enzyme from susceptible populations. Resistant populations control was too low with imazethapyr, chlorimuron-ethyl and flumetsulan herbicides at recommended rates. Although, sulfentrazone, bentazon, lactofen, fomesafen and acifluorfen herbicides, alone or in tank-mix with ALS inhibitor herbicides, showed more than 95% control of the resistant populations. The results allowed to conclude that *Bidens pilosa* L. populations were resistant to ALS enzyme inhibitor herbicides. The resistance was probably due to ALS enzyme alterations becoming it insensitive to herbicide inhibition. The populations insensitivity to different chemical groups with the same mechanism of action showed that the studied populations had cross-resistance. Herbicides with distinct mechanism of action can be useful tool of weed management of *Bidens pilosa* L. in order to delay or control the appearance of resistant weed populations.

1. INTRODUÇÃO

O advento dos herbicidas representou um avanço nas técnicas de controle de plantas daninhas, pois estas plantas são responsáveis por significativas perdas na produção agropecuária. Rapidamente, as áreas tratadas com herbicidas expandiram-se em todo o mundo, fato este corroborado pelo grande desenvolvimento da tecnologia de aplicação e pela introdução de numerosas novas moléculas.

A pressão de seleção exercida pelo agente químico no agroecossistema, muitas vezes, leva à diminuição na população de indivíduos suscetíveis, ou mesmo sua eliminação, possibilitando a ampliação do nicho ecológico ocupado por populações até então secundárias. Por outro lado, dentro de uma população de indivíduos da mesma espécie, esta pressão de seleção pode destruir os genótipos suscetíveis. Neste caso, mesmo em proporções muito baixas, alguns indivíduos resistentes podem sobreviver e, sem a competição intraespecífica, multiplicarem-se, aumentando em número. Com a manutenção de aplicações repetidas de herbicidas com um mesmo mecanismo de ação, somente

os indivíduos resistentes sobrevivem e reproduzem-se, formando populações resistentes.

O fenômeno do aparecimento de resistência é conhecido há muito tempo e começou a despertar maior interesse na última década, com a introdução de novos grupos químicos de herbicidas altamente eficientes e específicos quanto ao sítio de ação. Entre estes grupos químicos, as sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopyrimidinas sulfonamidas e pirimidiloxibenzoatos que, embora quimicamente diferentes, inibem a mesma enzima, a acetolactato sintase (ALS) também chamada sintase dos acetohidroxiácidos (AHAS), cujo código é EC 4.1.3.18, uma das enzimas responsáveis pela catálise da reação de formação dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina.

Estes herbicidas, de elevada eficácia e baixa toxicidade, apresentam um mecanismo de ação bastante específico, sendo utilizados em doses baixas. Apesar disso, vários exemplos do aparecimento de resistência a estes herbicidas têm sido relatados em diversas partes do mundo.

No Brasil, em áreas cultivadas com a cultura da soja, após anos seguidos da aplicação de herbicidas inibidores da enzima ALS, indivíduos da espécie *Bidens pilosa* L., conhecidos como picão-preto, passaram a não mais responder a ação destes herbicidas. Em pouco tempo, dada a prolificidade desta planta, as densidades de populações resistentes aumentaram grandemente, aparecendo em muitas áreas de produção da cultura da soja nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul.

Visando determinar a existência da resistência, estabelecendo a magnitude das doses necessárias para provocar o mesmo efeito em biotipos suscetíveis e resistentes, esta pesquisa foi conduzida em casa-de-vegetação e laboratório. Averiguou-se a hipótese do fenômeno observado ser efetivamente resistência e se esta resistência tem origem em mudanças da atividade da enzima ALS, capazes de alterar sua sensibilidade diante dos herbicidas empregados. Ao mesmo tempo, foi testada a hipótese da existência de resistência cruzada.

Alternativamente, foram testados herbicidas, pertencentes a outros grupos de classificação quanto ao mecanismo de ação. Verificou-se a capacidade deles controlarem esta planta daninha para um possível emprego em programa de manejo de populações resistentes. O objetivo é restabelecer as populações originais e retardar ou evitar o aparecimento de populações resistentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas

Muitas definições têm sido propostas para a resistência das plantas daninhas aos herbicidas. GRESSEL & SEGEL (1978) relacionaram a resistência à dose na qual as plantas daninhas sobrevivem aos herbicidas, doses estas tóxicas normalmente para as plantas sensíveis. Para WARWICK (1991) a resistência é a condição onde as plantas daninhas sobrevivem às doses normalmente empregadas no campo, como resultado da seleção ou da resposta genética às repetidas exposições a herbicidas com mecanismos de ação similares. Nesta linha, SAWICKI (1987) propõe uma definição que incorpora não somente a dose recomendada mas também o conceito de evolução, realçando que a resistência marca uma resposta genética à seleção imposta pelos herbicidas.

HOLT & LeBARON (1990) afirmam que qualquer definição do termo resistência deve estar relacionado com a utilização do herbicida no campo, em sua dose recomendada para o controle das plantas daninhas. Assim, é importante destacar o que é resistência e o que é tolerância. A resistência é a

habilidade da população de plantas de resistir a doses significativamente maiores do que os biotipos predominantes na população selvagem podem suportar. Já a tolerância é relacionada com a dose do herbicida que a planta é capaz de suportar antes mesmo de haver qualquer pressão de seleção por herbicidas.

Outra definição diz respeito aos termos resistência cruzada e resistência múltipla. No primeiro caso, POWLES & HOWAT (1990) descrevem a resistência cruzada de plantas daninhas quando biotipos que desenvolveram a resistência, através de um único mecanismo de resistência, após uma pressão de seleção por um herbicida, exibem resistência a outro herbicida quimicamente diferente, porém com o mesmo mecanismo de ação. Além de concordar com este aspecto, RUBIM (1991) complementa que o termo resistência múltipla deveria ser usado em casos onde a planta é resistente a herbicidas de diferentes mecanismos de ação, decorrente de dois ou mais mecanismos de resistência distintos. Neste particular, o fenômeno resistência pode ocorrer por ligações ou características pleiotrópicas ou como um outro mecanismo secundário de resistência (LeBARON & MACFARLAND, 1990).

O aparecimento de organismos resistentes a inseticidas e fungicidas aumentou rapidamente após as décadas de 50 e 60, respectivamente. HOLT & LeBARON (1990) citam que no final dos anos 80 mais de 500 espécies de insetos e acima de 150 espécies de patógenos de plantas cultivadas haviam desenvolvido resistência. No caso de herbicidas, o primeiro relato foi feito por RYAN (1970) que observou biotipos resistentes de *Senecio vulgaris* a herbicidas do grupo químico das triazinas. Após esta divulgação, muitos biotipos resistentes

a outras classes de herbicidas foram citados. LeBARON (1991) e LeBARON (1992) relatam que, no ano de 1990, ao redor de 113 biotipos de plantas daninhas haviam sido registrados por pesquisadores de várias regiões do mundo. Estes biotipos incluíam 58 espécies resistentes a triazinas e 55 espécies resistentes aos outros grupos de herbicidas, como : bupiridilos, inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), feniluréias, ácidos fenoxiacéticos, inibidores da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase), dinitroanilinas, amidas, triazoles, uracilas, carbamatos, piridazinas, nitrilos, organoarsenicais, derivados do ácido picolínico, etc. Além dos trabalhos descritos acima, WARWICK (1991) e HOLT *et alii* (1993) citam outros exemplos de plantas daninhas resistentes.

Na Europa, biotipos de 36 espécies de plantas daninhas que desenvolveram resistência a triazinas foram citadas no trabalho de VAN OORSCHOT (1991). No Reino Unido foram encontrados biotipos resistentes das espécies *Chenopodium album*, *Erigeron canadensis*, *Matricaria matricarioides*, *Senecio vulgaris* e *Solanum nigrum* às triazinas e das espécies *Epilobium ciliatum* e *Poa annua* às triazinas e ao paraquat (CLAY, 1989). LUTMAN (1990) relata resistência de *Stellaria media* ao herbicida mecoprop e MORRISON *et alii* (1990) de *Setaria viridis* ao herbicida trifluralin. CAREY III *et alii* (1995) confirmaram a resistência de *Echinochloa crus-galli* ao propanil em 115 amostras de sementes coletadas em regiões produtoras do Estado do Arkansas (EUA). Nos grupos mais resistentes, foi determinado um fator de 20 vezes na dose necessária para provocar o mesmo efeito nos biotipos resistentes em relação aos biotipos suscetíveis

Entre as regiões e países onde a ocorrência de resistência está documentada, pode-se citar a maioria das regiões dos Estados Unidos, diversas províncias da Canadá, 18 países europeus e outros 11 países ao redor do mundo. As plantas daninhas resistentes às triazinas infestam cerca de 1 milhão de hectares nos Estados Unidos e outros 2 milhões de hectares em outros países (LeBARON, 1991). No Brasil, o primeiro caso documentado de resistência foi informado por CHRISTOFFOLETI *et alii* (1996) e PONCHIO *et alii* (1996), para a planta daninha *Bidens pilosa* L. .

2.2. Fatores que afetam o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes.

Normalmente existe nas áreas agrícolas uma pequena proporção de indivíduos tolerantes aos herbicidas, mesmo antes da primeira aplicação destes herbicidas. Uma vez que estas populações são submetidas a pressão de seleção pelas aplicações dos herbicidas, estes indivíduos tolerantes, já existentes, sobrevivem e aumentam em número. Entretanto, esta frequência inicial é bastante baixa. Com relação às triazinas, GRESSEL (1991) mostra que a frequência inicial do genoma resistente está entre 10^{-10} e 10^{-20} plantas por hectare. No caso dos herbicidas inibidores da enzima ALS, esta frequência inicial é mais alta, ao redor de 10^{-6} plantas por hectare, segundo STANNARD & FAY (1987). O desenvolvimento de modelos baseados nestas estimativas, assim como em

aspectos de competitividade e de eficiência reprodutiva, podem colaborar no manejo de áreas infestadas por planta daninhas resistentes (ROUSH *et alii*, 1990).

Embora muito variável e difícil de ser prevista, esta frequência inicial pode ser responsável pelo aparecimento de indivíduos resistentes em proporção tal que o herbicida passa a ser ineficiente. THILL *et alii* (1991) relatam que estes níveis aparecem depois de 3 a 5 anos de aplicação do herbicida chlorosulfuron, um inibidor da enzima ALS. No caso de triazinas, este período é mais longo, 6 a 10 anos de uso consecutivo (BANDEEN *et alii*, 1982).

A adaptação ecológica é definida como o sucesso reprodutivo ou a proporção de genes que um indivíduo deixa no conjunto de genes da população. Estes dois componentes são fundamentais para o sucesso da adaptação ecológica com reflexos na sobrevivência e reprodução (SILVERTOWN, 1987).

No caso do aparecimento de resistência às triazinas, vários aspectos levam a uma menor eficiência fisiológica, bioquímica e alterações de muitos atributo de forma negativa nestes biotipos. São relatados casos de menor taxa de atividade fotossintética, níveis reduzidos de fixação de CO₂, produção fotossintética líquida, produção de biomassa, fecundidade e menor competitividade entre biotipos resistentes e suscetíveis (CONARD & RADOSEVICH, 1979; HOLT *et alii*, 1981; AHRENS & STOLLER, 1983; JURINIC & PEARCY, 1988; HOLT, 1990a; HOLT, 1990b). Por outro lado, SCHONFELD *et alii* (1987) afirmam que parâmetros do potencial de crescimento de algumas

plantas daninhas resistentes às triazinas são similares àqueles encontrados em populações suscetíveis. Isto foi determinado tanto em experimentos de campo quanto em experimentos em condições não competitivas. GRAY *et alii* (1995) estudaram a habilidade competitiva de biotipos de *Abutilon theophrasti* resistentes e suscetíveis às triazinas e não encontraram diferenças. Da mesma forma, CHAUVAL & GASQUEZ (1991) não observaram taxa de crescimento inferior em *Alopecurus myosuroides* resistentes ao herbicida chlorotoluron.

DARMENCY & GASQUEZ (1990), para o caso do grupo das triazinas e da planta daninha *Chenopodium album*, afirmam que os principais fatores envolvidos no aparecimento de resistência são: a estrutura genética e variabilidade da população; a presença de genótipos incomuns que tiveram alta taxa de mutação; a ocorrência de fenótipos resistentes já à baixas doses, os quais podem ser os precursores dos fenótipos resistentes à altas doses; e o potencial de multiplicação e distribuição da espécie.

Ao contrário da tendência do custo de seleção imposto às plantas resistentes às triazinas, no caso de espécies resistentes aos herbicidas inibidores da ALS isso não tem sido observado (ALCOCER-RUTHLING *et alii*, 1992a; CHRISTOFFOLETI & WESTRA, 1992a; THOMPSON & THILL, 1992). CHRISTOFFOLETI & WESTRA (1992b) relatam resultados mostrando que plantas resistentes de *Kochia scoparia* foram pelo menos tão competitivas quanto plantas suscetíveis. CHRISTOFFOLETI (1993) mostrou que plantas de *Kochia scoparia* resistentes alocaram mais recursos para a produção de folhas e sementes que plantas suscetíveis. ALCOCER-RUTHLING *et alii* (1992b) e DYER

et alii (1993) informaram que biotipos resistentes de *Lactuca serriola* e *Kochia scoparia* germinam mais rápido e a temperaturas menores que biotipos suscetíveis. Os primeiros autores não encontraram diferenças na quantidade produzida de sementes e na viabilidade das mesmas entre biotipos resistentes e suscetíveis de *Lactuca serriola*. Neste trabalho, concluem que talvez uma menor habilidade competitiva seja compensada por uma germinação precoce.

Para o caso dos herbicidas inibidores da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase), WIEDERHOLT & STOLTENBERG (1996a) trabalhando com biotipos resistentes de *Digitaria sanguinalis* e WIEDERHOLT & STOLTENBERG (1996b) com biotipos resistentes de *Setaria faberi*, comparados aos similares suscetíveis, verificaram ausência de diferenças no desenvolvimento e na competitividade.

Biotipos resistentes de *Lolium rigidum*, tanto aos herbicidas inibidores da ALS quanto aos herbicidas inibidores da ACCase, não mostraram diferenças de comportamento nos trabalhos de MATTHEWS *et alii* (1990) e HOLTUM *et alii* (1991). Com biotipos desta mesma planta, igualmente resistentes a ambos os grupos de herbicidas, GILL *et alii* (1996), obtiveram os mesmos resultados, ressaltando-se a possível maior taxa de emergência de plântulas nos biotipos resistentes aos herbicidas inibidores da ACCase, principalmente do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (AOPP).

A manutenção e o manejo de um rico banco de sementes no solo pode retardar o aparecimento de biotipos de plantas resistentes a um determinado herbicida. Sementes com longa dormência necessitam pressões intensas de

seleção e, mesmo assim, demoram mais tempo para serem esgotadas. As características de longevidade e germinação de sementes de plantas daninhas e o sistema de cultivo utilizado na área determinam a velocidade do aparecimento de plantas resistentes (GRESSEL & SEGEL, 1990). Outros modelos têm sido propostos para estudar a dinâmica das plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Consideram que a sobrevivência e a fecundidade, influenciadas pela competição entre plantas, afetam a adaptação dos biotipos resistentes e dos biotipos suscetíveis. Concomitantemente, a sobrevivência e a fecundidade contribuem para o fluxo de genes no espaço e no tempo, alterando a frequência de alelos resistentes e suscetíveis, em função da imigração de pólen e sementes, da dormência das sementes e do tipo de sistema de seleção imposto (MAXWELL *et alii*, 1990; MAXWELL, 1992; MAXWELL *et alii*, 1993).

Muitos fatores estão envolvidos na resistência de biotipos de plantas daninhas. FUERST & HORMAN (1991) afirmam que a resistência de plantas daninhas à atrazina é devida a mutações, alterando o sítio de ação na membrana tilacóide no cloroplasto.

A alteração no sítio de ação tem sido relatada como o principal motivo de resistência aos herbicidas altamente específicos como os inibidores enzimáticos. Porém, podem ser citadas outras alterações que levam a diminuição na sensibilidade aos herbicidas, tais como absorção, translocação e metabolismo diferencial entre biotipos resistentes e suscetíveis.

FUERST & VAUGHN (1990) citam dois mecanismos envolvidos na resistência ao herbicida paraquat. O primeiro mecanismo seria o rápido

sequestro do paraquat, reduzindo sua concentração no sítio de ação no cloroplasto. O segundo mecanismo, de funcionamento concomitante, seria a desintoxicação enzimática do superóxido e outras formas tóxicas que o oxigênio assume em função da presença do herbicida. COMPLAND (1991) mostra que a compartimentalização, pode ser responsável, pelo menos em parte, por alguns casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Pode ser alcançada pelo armazenamento destes herbicidas, ou de seus metabólitos tóxicos, no vacúolo das células ou tecidos localizados em pontos distantes dos sítios de ação dos herbicidas. Segundo DODGE (1991) este pode ser o mecanismo de resistência em algumas espécies para o herbicida paraquat.

VAUGHN *et alii* (1990), comprovaram que a presença de resistência a dinitroanilinas em biotipos de *Eleusine indica* está relacionada a alterações na formação dos microtúbulos e fusos acromáticos durante a mitose. Estas alterações estruturais dos componentes tornava os biotipos resistentes insensíveis à ação dos herbicidas (VAUGHN & VAUGHN, 1990).

O trabalho de JASIENIUK *et alii* (1996) estudou vários aspectos já mencionados nesta revisão. Afirma que fatores evolutivos influenciam o aparecimento de resistência e propõe o uso de modelos para estudar este fenômeno, contendo informações sobre: frequência inicial de alelos resistentes; probabilidade de mutação; herdabilidade; competitividade da planta daninha na presença e na ausência do herbicida; e o fluxo de genes na população e entre populações.

2.3. Herbicidas inibidores da enzima ALS e resistência

Os herbicidas classificados como inibidores da enzima ALS, compõem uma categoria altamente eficiente de herbicidas com um mecanismo comum de ação. Os grupos químicos sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopyrimidinas sulfonamidas e ácidos pirimidil salicílicos (pirimidiloxibenzoatos), embora diferentes, inibem a mesma enzima, a acetolactato sintase (ALS), também conhecida como sintase dos acetohidroxiácidos (AHAS), codificada como EC 4.1.3.18., segundo CHALEFF & MAUVAIS (1984), CHALEFF & RAY (1984), RAY (1984), SHANER *et alii* (1984), LaROSA & SCHLOSS (1984), SUBRAMANIAN & GERWICK (1989), GERWICK *et alii* (1990), SUBRAMANIAN *et alii* (1990) e SHIMIZU *et alii* (1994). BEYER *et alii* (1984) e DUKKY *et alii* (1988) mostram o constante desenvolvimento de novas moléculas de herbicidas do grupo das sulfoniluréias. Estes herbicidas são usados em doses bastante baixas, para o controle de plantas daninhas, nas culturas mais importantes das diversas regiões do mundo. Os outros grupos químicos aludidos têm características semelhantes.

STIDHAM & SINGH (1991) relatam que a descoberta do mecanismo de ação dos herbicidas da classe das imidazolinonas trilhou os seguintes passos : (1) tratando-se culturas de células de milho com estes herbicidas houve uma diminuição no teor dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, cuja primeira enzima na biossíntese é a ALS; (2) a suplementação

destes aminoácidos reduziu os sintomas de sua deficiência; (3) a ALS foi inibida por imidazolinonas em estudos “in vitro”; (4) plantas tratadas com imidazolinonas apresentavam baixa atividade desta enzima; (5) a ALS extraída de plantas resistentes não foi inibida mostrando que, em muitos casos, a ALS era insensível.

A participação da enzima ALS no metabolismo é explicitada por SINGH *et alii* (1988a). Ela é a primeira enzima na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. Duas moléculas de piruvato produzem acetolactato e CO_2 ou uma molécula de piruvato e uma molécula de α -cetobutirato produzem acetohidroxibutirato e CO_2 , reação intermediada pela enzima. Para que a enzima catalise a reação, é necessário a presença de : tiamina pirofosfato (TPP), que age como uma coenzima; flavina adenina dinucleotídeo (FAD), é considerada outra coenzima que estabiliza a enzima ALS causando um efeito moderado de aumento em sua atividade, havendo, porém, alguma obscuridade em sua participação exata; e Mg^{2+} que, presumivelmente, liga o TPP à enzima. No primeiro passo da reação, um complexo intermediário é formado entre o piruvato e o C_2 do TPP, o qual precede a descarboxilação do ânion estabilizado, o hidroxietilTPP. Este age como um nucleófilo do 2-ceto-grupo de uma segunda molécula de piruvato ou α -cetobutirato, liberando o TPP e acetolactato ou acetohidroxibutirato. Em resumo, segundo BRYAN (1990), a ALS catalisa a reação onde 2 moles de piruvato produzem 1 mol de 2-acetolactato ou a reação onde 1 mol de piruvato mais 1 mol de α -cetobutirato produzem 1 mol de 2-aceto-2-hidroxibutirato.

Entre as propriedades da enzima, SCHLOSS *et alii* (1988) relatam que os aminoácidos valina, leucina e isoleucina promovem uma retroinibição. Propõem que o sítio específico dos herbicidas na enzima seria um vestígio evolucionário da ligação de quinona da enzima piruvato oxidase. Indicam, como uma prova deste fato, que os homólogos Q_0 e Q_1 da ubiquinona são potentes inibidores da ALS. Ainda nesta linha, DURNER *et alii* (1990) informam que os herbicidas do grupo das imidazolinonas exercem uma inibição não-competitiva, já que a ligação com a enzima dá-se após a formação do complexo terciário enzima-piruvato-TPP.

SINGH *et alii* (1988b) mostram que a atividade da enzima extraída de *Phaseolus lunatus* diminuiu com a idade, à exceção dos pontos de crescimento, onde permaneceu praticamente constante. Análises da enzima extraída de plantas mostraram dois picos de atividade para formação de acetolactato, indicando que ela ocorre em duas formas : ALS I de peso molecular 193.000 Da que representa 90% do total e ALS II de peso molecular 55.000 Da complementando os restantes 10%. A interpretação ainda não é clara, mas acredita-se que as duas formas representam diferentes estados de agregação da mesma enzima, com a ALS I sendo uma forma multimérica (tetramérica) da ALS II, a forma monomérica.

A determinação da atividade da ALS baseia-se no método de WESTERFELD (1945), que tem como princípio a formação de um complexo colorido na reação entre o acetolactato (formado pela ALS), a creatina e o naftol,

cuja densidade ótica a 530 nm é proporcional à concentração do acetolactato formado pela enzima na reação.

GERWICK *et alii* (1993) e SIMPSON *et alii* (1995) descrevem um método simples de avaliar comparativamente a atividade da ALS. O método baseia-se na acumulação diferencial de acetoína na presença e na ausência de herbicidas inibidores. A acumulação é induzida pela inibição da enzima ceto-ácido-reductoisomerase, a enzima seguinte na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada. O inibidor desta enzima utilizado é o ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico (CPCA). A base para a distinção entre biotipos resistentes e suscetíveis é a quantidade de acetoína formada, que será maior nos biotipos onde a enzima ALS não sofreu inibição. Se houver interesse, a partir deste ponto, emprega-se o método de WESTERFELD (1945) para quantificar a acetoína formada. Pode-se concluir se há resistência ou tolerância por comparação baseada na cor obtida.

Outro sistema foi proposto por SEKI *et alii* (1996). Desenvolveram um sensor enzimático para a detecção de herbicidas do grupo das sulfoniluréias. O sensor é montado com um eletrodo de oxigênio, pois na reação catalisada pela ALS há consumo de oxigênio, o qual é então aprisionado por uma matriz de polímero de PVA-SbQ, que está ligada ao referido eletrodo. A sensibilidade chega a concentrações de até 10^{-6} M do herbicida. Por este método pode-se concluir pela funcionalidade ou não da enzima.

STIDHAM (1990) afirma que a tolerância e seletividade dos herbicidas inibidores da enzima ALS em culturas deve-se, primeiramente, ao

rápido metabolismo do herbicida a formas não-tóxicas, como é o caso da cultura da soja. As conclusões de SWEETSER *et alii* (1982) são semelhantes. O metabolismo pelas plantas é a base de seletividade de herbicidas do grupo das sulfoniluréias em culturas de cereais.

Por outro lado, tem sido observado o aparecimento espontâneo de resistência devido a alterações na enzima que impedem a inibição pelos herbicidas. O gene que codifica a enzima ALS é nuclear com expressão nos plastídeos (MALLORY-SMITH, 1990). A enzima possui 670 aminoácidos com um peso molecular de cerca de 73 KDa. Dois tipos de alterações nas proteínas dominantes, codificados pelo gene da ALS, parecem influenciar a resistência, segundo GUTTIERI *et alii* (1992). O primeiro, chamado de dominante A, apresenta a substituição de uma prolina, na posição do aminoácido 173, por uma serina, glutamina ou alanina, conferindo resistência. Um segundo, dominante B, confere uma ampliação no nível de resistência em tabaco (LEE *et alii*, 1988).

GUTTIERI *et alii* (1992) caracterizaram a sequência de uma região de 196 pares de bases do DNA do gene da ALS em *Kochia scoparia*, *Russian thistle* e *Lactuca serriola*. No caso da última planta, genes dos biotipos resistentes e suscetíveis diferem em um único ponto de mutação, onde uma histidina foi substituída por uma prolina. Para *Kochia scoparia*, a diferença na sequência do DNA entre plantas suscetíveis e resistentes foi no mesmo ponto, com um “códon” para serina substituindo um “códon” para treonina. Duas sequências diferentes foram detectadas em *Russian thistle* e, neste caso, nenhuma sequência de codificação para substituição de aminoácidos foi diferente

do biotipo suscetível. Os resultados foram semelhantes em estudo realizado por EBERLEIN & GUTTIERI (1993) após o sequenciamento dos genes de diferentes biotipos resistentes de *Kochia scoparia*. Os biotipos mais resistentes tinham uma mutação no “códon” para um resíduo de prolina como no estudo prévio. Entretanto, a natureza das substituições foi variável, com 5 aminoácidos diferentes sendo substituídos. Observou-se a substituição de alanina, arginina, glutamina, leucina e treonina por uma prolina. Outra conclusão deste trabalho é que outras regiões do gene da ALS podem estar sofrendo alterações que produzem resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

As alterações genéticas determinantes das alterações moleculares da enzima ALS, podem ter fluxos diferenciais entre gerações de uma determinada planta daninha, cujo aparecimento de indivíduos resistentes é detectado. A polinização cruzada, a dispersão do pólen e a viabilidade deste tem sido estudada em biotipos resistentes e suscetíveis de *Kochia scoparia*. Tais estudos mostraram que, neste caso, a troca genética, via polinização cruzada, entre biotipos resistentes e suscetíveis, variou de 0,5 a 13% em condições de campo (MULUGETA *et alii*, 1992; THILL *et alii*, 1993). A hibridização foi observada até a distância de 30 m da fonte mais próxima (STALLINGS *et alii*, 1993). No caso desta planta, que possui 18 cromossomos e é diplóide (SIVAKUMARAN *et alii*, 1991), a herdabilidade da resistência aos herbicidas inibidores da ALS foi de 19%, ou seja, plantas suscetíveis cruzadas com plantas resistentes produziram uma progênie contendo 19% de plantas suscetíveis (MULUGETA *et alii*, 1991). Estes autores calcularam em 3:1 a taxa de segregação e concluíram que o caráter

resistência é um caráter dominante ou semi-dominante, controlado por um simples par de genes.

Em *Lactuca serriola*, MALLORY-SMITH (1990) observaram que o caráter resistência é controlado igualmente por um simples par de genes nucleares com dominância incompleta. Concluíram, também, que plantas intermediárias homozigotas ou heterozigotas sobrevivem ao tratamento com herbicida nas doses normalmente recomendadas para uso no campo.

A resistência aos herbicidas inibidores da ALS, como foi discutido, pode ser devido a mutações no gene que codifica a enzima. Esta mutação, muitas vezes, é acompanhada por diferentes níveis de resistência às diferentes moléculas, como relatam os trabalhos de HALL & DEVINE (1990), PRIMIANI *et alii* (1990), SAARI *et alii* (1992), SIVAKUMARAN *et alii* (1991), HORAK & PETERSON (1995) e KWON & PENNER (1995). Em todos estes exemplos, a resistência foi caracterizada como uma insensibilidade da enzima ALS.

Por outro lado, biotipos de *Lolium rigidum* Gand. e *Alopecurus myosuroides* foram descritos como resistentes às sulfoniluréias (HEAP & KNIGHT, 1986; KEMP *et alii*, 1990) e, embora selecionados em áreas que não receberam sulfoniluréias, estes biotipos mostram resistência a vários herbicidas, inclusive estas. Esta resistência é devida ao aumento do metabolismo capaz de converter os herbicidas em compostos menos tóxicos, segundo KEMP *et alii* (1990) e CHRISTOPHER *et alii* (1991). SHANER (1991) faz uma discussão dos possíveis mecanismos envolvidos na resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS e inclui os casos descritos.

BROWN & COTTERMAN (1994) relatam o crescente aparecimento de casos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. O primeiro caso apareceu em 1987 (PRIMIANI *et alii*, 1990; MALLORY-SMITH *et alii*, 1990), cinco anos após a primeira distribuição comercial do herbicida chlorsulfuron. Desde a descoberta da resistência, tanto em sulfoniluréias quanto em imidazolinonas, crescentes casos têm sido documentados e, em outubro de 1993, contavam 1187 localidades, incluindo 15 espécies de plantas daninhas.

2.4. Desenvolvimento de culturas resistentes

A abordagem da utilização dos conceitos de resistência ganha corpo cada vez maior, com grandes empresas em todo o mundo investindo na geração de produtos biotecnológicos, incorporando resistência a variedades cultivadas. A questão é polêmica suscitando muitas discussões. NEWHOUSE *et alii* (1990) apresentam uma abordagem positiva : a alta tecnologia pode tornar as culturas resistentes aos herbicidas já desenvolvidos; muitas culturas, de mercado pequeno, poderiam ser beneficiadas por este método; o controle de plantas daninhas ganharia mais uma alternativa, havendo estímulo para o registro de novos herbicidas, com bom espectro de controle, mas com seletividade insuficiente; e prevêem uma diminuição de problemas com resíduos indesejáveis de herbicidas em culturas em rotação. HARRISON JR (1992) expõe que o desenvolvimento de culturas resistentes está sendo acompanhado por uma redução na descoberta de novos herbicidas. Cita como vantagens: o aumento na

margem de segurança com uma diminuição de injúrias; a diminuição do risco de resíduos para culturas em rotação; a introdução de novos herbicidas para o controle de plantas daninhas em culturas normalmente sensíveis. O uso desta técnica tem potencial para a redução de problemas ambientais, pelo uso de herbicidas mais específicos e seguros. WISE (1992), em um sentido oposto, pondera que uma tecnologia não é boa nem má por si mesma pois depende da maneira como é usada. Aponta alguns perigos potenciais, como: o uso contínuo de herbicidas com um mesmo mecanismo de ação pode levar ao aparecimento de resistência de plantas daninhas; para evitar confusões entre os cultivares resistentes e não resistentes, são necessárias ações para informar os produtores; recomenda que o setor de pesquisa deve trabalhar para conhecer melhor esta tecnologia, determinando se existe segurança para os alimentos e para a qualidade da água, estabelecendo novas técnicas de produção e analisando a rentabilidade esperada para os produtores .

A transferência desta tecnologia deve ser feita por pessoal altamente capacitado, para KNAKE (1992), a fim de serem evitados problemas não previstos. GOLDBURG (1992) manifestou a preocupação ambiental, prevendo um aumento no uso de herbicidas. Recomenda políticas que priorizem as pesquisas do setor público para estudar o impacto global desta tecnologia. Afirma que no caso de florestas, o desenvolvimento de espécies arbóreas resistentes seria um contra-senso. As florestas possuem um duplo propósito : produção de madeira e reposição de matas e lazer com a visitação pública. Não concorda com o uso de herbicidas nestes ecossistemas. Por fim, clama pela

necessidade urgente de legislação apropriada para regulamentar esta área. RADOSEVICH *et alii* (1992) discutem as questões éticas envolvidas no uso desta tecnologia. O caráter interdisciplinar deve governar o estudo do impacto desta tecnologia, envolvendo todas as sub-áreas da ciência das plantas daninhas e da ética. Entre os problemas, citam o aumento de custos, a possibilidade dos genes de resistência escaparem para outras populações e as questões éticas da manipulação de organismos vivos.

Um bom resumo de custos e benefícios pode ser visto em BURNSIDE (1992). A pesquisa sempre buscou novos herbicidas testando-os sobre as culturas. Porém, com as técnicas de culturas de tecidos e de transferência de genes, consegue-se a produção de genótipos tolerantes. As vantagens seriam: solução mais rápida para o problema de plantas daninhas de difícil controle; nova alternativa para os produtores; opção para culturas de menor importância econômica; possíveis vantagens econômicas; aumento no uso de herbicidas mais seguros ao meio ambiente. Por outro lado aponta algumas restrições: esta técnica não elimina o uso de herbicidas; as culturas podem tornar-se plantas daninhas; pode facilitar a perda na diversidade ecológica, já comprometida em ambientes agrícolas; pode resultar em mais resíduos de herbicidas; as culturas resistentes podem ser menos competitivas; pode promover a diminuição das práticas que os produtores normalmente usam.

O que se procurava na introdução de resistência à herbicidas inibidores de enzima ALS em cultivares comerciais, segundo SCHLOSS & AULABAUGH (1990), era que a mutação ou transformação da enzima não

afetasse sua atividade. Assim, os herbicidas, ao ligarem-se à sítios de ação distantes do sítio ativo da enzima, não afetariam o seu funcionamento. A substituição de aminoácidos, fator que confere resistência, não afetaria as propriedades cinéticas e regulatórias da enzima. NEWHOUSE *et alii* (1991b) apontam que os herbicidas do grupo das imidazolinonas, representam um grupo de interesse para a introdução de resistência em culturas pois mostram muitas características favoráveis como : bom espectro de controle; baixo impacto ambiental; baixa toxicidade à mamíferos; flexibilidade de aplicação; e registro em muitos países para usos variados. Relatam que os seguintes métodos podem trazer sucesso no desenvolvimento de resistência: indução de mutagênese em calos de cultura “in vitro”, como feito na cultura do milho; seleção em culturas de células em suspensão; e seleção de culturas haplóides, de microsporos, como feito em canola.

A respeito dos métodos de seleção, HARRISON (1995) cita os seguintes : a inserção de genes; seleção de mutantes tolerantes, desde o uso de células até plantas inteiras; e seleção de populações que variaram naturalmente dentro de uma espécie cultivada. Para ser útil, uma seleção resistente deve ser transferível para outras variedades por métodos convencionais. Aponta algumas causas de contratempos que levam a uma menor adaptação dos materiais : pouca colaboração entre cientistas; falta de legislação e; falta do uso do caráter resistência à herbicidas em programas de melhoramento.

O desenvolvimento de culturas resistentes transgênicas tem sido feito com êxito. TSAFTARIS (1996) relata que a engenharia genética visa: a

amplificação da expressão e genes internos; a transferência de genes que codificam enzimas tolerantes aos herbicidas e; a transferência de genes que codificam enzimas que modificam os herbicidas. OTT *et alii* (1996) mostram que, para classes de herbicidas com sítios de ação específica, como é o caso dos inibidores da enzima ALS, a inserção de genes codificadores para enzimas mutantes pode ser feito com sucesso. Mostram que um artifício adicional é o emprego de modelos computadorizados tridimensionais da enzima, permitindo um estudo mais apurado dos possíveis sítios de mutação ou de acoplamento inibitório de herbicidas. Este método tem várias vantagens sobre os métodos tradicionais de indução de mutagênese e seleção. Tal técnica representa um avanço para o futuro desenvolvimento de herbicidas mais específicos, eficientes e seguros para o ambiente.

Trabalhando em milho, NEWHOUSE *et alii* (1991a), isolaram o gene XA17 de resistência a imidazolinonas, o qual está sendo introduzido em muitas variedades cultivadas. Trata-se de um gene semi-dominante, com os indivíduos homozigotos mostrando tolerância consideravelmente maior que os indivíduos heterozigotos. CURRIE & REGEHR (1995) estudaram métodos de medir o impacto do gene XA17 sobre a cultura do milho, no que diz respeito aos efeitos da aplicação do herbicida imazethapyr. Traçaram curva de dose-resposta para dados de campo e de laboratório. Verificaram que o herbicida imazethapyr reduziu a absorção de radiação fotossinteticamente ativa em 8,3% uma semana após a aplicação. Porém, o reflexo na altura das plantas desapareceu cerca de 5 semanas após a aplicação.

Um exemplo de uso relevante do método de seleção através de culturas de células haplóides, submetidas à mutagênese, está descrito nos trabalhos de SAXENA & KING (1990) e RATHINASABAPATHI & KING (1991). Conseguiram isolar células de *Datura innoxia* resistentes, capazes de sobreviver à doses de herbicidas cerca de 1.000 vezes superiores em relação às doses toleradas pelas células comuns. O estudo da enzima isolada permitiu concluir que a resistência era devida a uma mutação. A constante de Michaelis (K_m) foi superior nas células resistentes, quando expostas aos herbicidas, em relação às células normais.

Na cultura do milho, CURRIE *et alii* (1995) compararam vários híbridos em laboratório, verificando a magnitude da resistência de híbridos homozigotos e heterozigotos, na presença dos herbicidas nicosulfuron, primisulfuron e imazethapyr. Concluíram que híbridos heterozigotos tinham tolerância intermediária e que alguns híbridos eram resistentes ao herbicida imazethapyr mas não aos herbicidas do grupo das sulfoniluréias. No caso específico do híbrido Pioneer 3180 IR, BERNASCONI *et alii* (1995) observaram que a substituição na enzima deu-se no aminoácido 552, que é um triptofano, aparecendo em seu lugar uma leucina. Este ponto simples de mutação conferiu resistência à várias classes de herbicidas. Este mesmo híbrido e o híbrido ICI 8532IT foram analisados por SIEHL *et alii* (1996). O híbrido Pioneer 3180IR foi altamente tolerante à todas as classes de herbicidas testadas, resistindo a doses entre 200 e 2000 vezes maiores que as doses normalmente empregadas. O segundo híbrido suportou doses 40 vezes superiores à dose normalmente usada

do herbicida imazethapyr e, em menor escala, tolerou os herbicidas imazaquin e pirimidiloxibenzoato. Porém, não foi tolerante aos herbicidas chlorsulfuron e flumetsulan.

Na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), BAUER *et alii* (1995) realizaram experimentos de campo e de laboratório para estudar diferenças de tolerância entre variedades ao herbicida imazethapyr. As diferenças observadas foram devidas a absorção, translocação e metabolismo diferencial. Algumas diferenças de atividade nas enzimas isoladas foram vistas e a herdabilidade do caráter resistência foi de 85%. Em função da espécie e da variedade, é possível a observação de tolerância diferencial à herbicidas de um mesmo grupo químico. É o caso mostrado por NOVOSEL & RENNER (1995) em beterraba açucareira. A tolerância ao herbicida nicosulfuron foi, pelo menos, 15 vezes superior que ao herbicida primisulfuron. Utilizando culturas de tecidos, RAJASEKARAN *et alii* (1996) isolaram células embriogênicas de algodão que sofreram mutação espontânea conferindo resistência entre 100 e 1000 vezes superior às células comuns. A frequência aproximada de ocorrência de células resistentes foi calculada em 1 em 2 milhões. A análise da sequência gênica revelou um ponto de mutação no “códon” para o aminoácido triptofano na posição 563, em um dos dois genes homólogos mutantes. Houve uma substituição pelos aminoácidos cisteína ou serina.

As vias de biossíntese de aminoácidos representam sítios com grande potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas (HAWKES, 1989). É interessante destacar as recomendações de ABELL (1996). Este autor descreve

a importância do desenvolvimento de novos herbicidas baseado em estratégias bioquímicas. O emprego destas informações para a identificação de enzimas, cuja inibição possa provocar fenótipos letais, tem alta probabilidade de permitir a descoberta de um novo herbicida. Paralelo a este fato, pode ser desenvolvida a tecnologia para a geração de culturas resistentes a este novo inibidor, com aplicação conjunta.

2.5. Estudo da resistência com curvas de dose-resposta.

O estudo da sensibilidade diferencial entre plantas diante da aplicação de herbicidas têm na utilização de curvas de dose-resposta uma poderosa ferramenta. Através deste procedimento, é possível o estabelecimento de gráficos que descrevem a tendência comportamental de uma espécie ou biotipo em função de um agente inibidor. Vários tratamentos matemáticos são propostos para a análise dos resultados experimentais.

O trabalho de SEEFELDT *et alii* (1995) propõe que a típica curva de dose-resposta é sigmóide no formato. São os modelos log-logísticos. Para construí-los, é necessário um planejamento dos ensaios, utilizando-se doses em escala logarítmica. A expressão matemática que relaciona a variável resposta y com a dose x é $y=f(x)=C+[(D-C)/1+(x/I_{50})^b]$, onde C é o limite superior, D é o limite inferior, b é a declividade da curva e I_{50} é a dose que produz 50% de diminuição na resposta da variável em questão. O uso de pacotes estatísticos requerem estimativas iniciais para serem empregados como ponto de partida no cálculo

destes parâmetros. Isto pode ser feito com o fornecimento de derivadas analíticas dos parâmetros, o que auxilia, sobremaneira, o estabelecimento destes modelos (STREIBIG *et alii*, 1993). O mesmo modelo, segundo BRAIN & COUSENS (1989), pode ser adaptado para o caso de doses muito baixas dos herbicidas provocarem efeitos estimulantes. Uma função que descreva o formato da curva contendo os pontos do efeito estimulante deve ser adicionada à expressão do modelo log-logístico. Outros exemplos de expressões não lineares são descritos por SEBER & WILD (1989).

WIEDERHOLT & STOLTENBERG (1995) e STOLTENBERG & WIEDERHOLT (1995) empregaram o modelo log-logístico para estudar a resistência cruzada de biotipos de *Digitaria sanguinalis* e *Setaria faberi*. HEAP & MORRISON (1996), estudando biotipos de *Setaria viridis* resistentes a herbicidas inibidores da ACCase, com o uso de modelos log-logísticos, concluíram que a dose necessária para provocar 50% de redução no crescimento era entre 2 e 54 vezes superior às necessárias para provocar o mesmo efeito em biotipos suscetíveis.

Várias respostas biológicas podem ser usadas como indicadores para o cálculo de curvas de dose-resposta. MURRAY *et alii* (1996b) desenvolveram um bioensaio com sementes para determinar a resistência de *Avena fatua* à herbicidas inibidores da enzima ACCase. O método consiste na germinação de sementes em meio de ágar contendo diferentes concentrações de herbicidas. Os resultados de crescimento de radículas e caulículos são comparados com a testemunha e utilizados para alimentar modelos log-logísticos.

Através da estimativa do anti-log consegue-se chegar a estimativas das doses que reduziriam em 50% o crescimento dos parâmetros avaliados. Para MURRAY *et alii* (1996a) dois alelos diferentes estariam codificando a resistência à herbicidas inibidores da enzima ACCase em *Avena fatua*.

Para o estabelecimento de curvas de dose-resposta, em função da escala de doses dos herbicidas e do comportamento das variáveis, podem ser utilizados modelos lineares, quadráticos, hiperbólicos, exponenciais, etc (STREIBIG *et alii*, 1993).

2.6. Prevenção e manejo de áreas com plantas daninhas resistentes

A experiência de outras áreas de defesa fitossanitária, no manejo de resistência, pode auxiliar o estabelecimento de técnicas para monitorar e controlar o fenômeno da resistência em plantas daninhas. GOULD (1995) discute que existem muitas diferenças entre o aparecimento de resistência em insetos e plantas daninhas. A estrutura genética das populações e a forma localizada de ocorrência em plantas daninhas podem facilitar o controle. No caso da comparação com a resistência a fungicidas, PEEVER & MILGROOM (1995) afirmam que o acúmulo de informações, de cunho evolucionário, do aparecimento de resistência em fungos pode ser utilizado, também, no manejo de resistência em plantas daninhas.

É necessário alterar as práticas normalmente usadas para o controle de plantas daninhas visando evitar ou retardar o aparecimento de plantas

daninhas resistentes (GRESSEL & SEGEL, 1989). O uso de herbicidas alternativos, com diferentes mecanismos de ação, pode representar uma estratégia de sucesso. Em algumas situações, plantas resistentes são mais facilmente controladas por outros tipos de herbicidas que os correspondentes biotipos suscetíveis (GRESSEL, 1990). Isso é normalmente denominado resistência cruzada negativa. O mesmo efeito pode ser obtido através do uso de sequências ou misturas de herbicidas. Para MALLORY-SMITH *et alii* (1993) e WRUBEL & GRESSEL (1994) a eficiência da mistura dependeria dos seguintes fatores: os herbicidas deveriam controlar o mesmo espectro de plantas daninhas; terem a mesma persistência; possuírem sítios de ação diferentes; exibirem degradação de forma alternativa; e, preferivelmente, exercerem uma resistência cruzada negativa. TONKS & WESTRA (1993) conseguiram excelente controle de biotipos resistentes de *Kochia scoparia*, aos herbicidas inibidores da enzima ALS, com herbicidas alternativos do grupo dos hormonais.

CHRISTOFFOLETI *et alii* (1994) apontam, ainda, os seguintes cuidados : manejo de herbicidas, que diminuam a pressão de seleção, e uma rotação de forma que o mesmo herbicida seja repetido apenas após 2 a 3 anos; observação do nível de dano econômico, exercendo o controle somente quando necessário reduzindo o uso desnecessário de herbicidas; rotação de culturas, já que muitas espécies apresentam sincronismo com as culturas que infestam e explorar o fato de que outras culturas podem permitir o uso de outros herbicidas; alterações no sistema de cultivo e; outras técnicas de manejo de plantas daninhas, envolvendo o uso de culturas ou cultivares mais competitivos,

espaçamento mais adensado, controle biológico, uso de cobertura morta e outros métodos não químicos.

O panorama de monitoramento da resistência nas diferentes regiões do mundo, onde o fenômeno apareceu há mais tempo, é apresentado por SHANER (1995). Apesar do aumento no número de casos, inclusive com exemplos de mais de um mecanismo de resistência em uma mesma planta daninha, não está provocando um crescimento alarmante nas preocupações. A atuação conjunta da indústria, universidades, serviços de extensão e produtores tem sido responsável por esta relativa tranquilidade. O desafio, segundo o autor, está no desenvolvimento de métodos econômicos e capazes de preservar o ambiente, para o controle de plantas daninhas, mantendo-se a produção de alimentos e produtos agropecuários em níveis capazes de abastecer o planeta. Para isso, recomenda a intensificação no esforço combinado do uso de herbicidas, já estabelecidos e novos, com outras práticas de manejo de plantas daninhas.

2.7. A planta daninha *Bidens pilosa* L.

o gênero *Bidens* possui mais de 15 espécies de importância ao redor do mundo, sendo a espécie *Bidens pilosa* L. a de maior transcendência, sendo uma planta daninha presente na maioria dos países latinoamericanos, infestando culturas anuais e perenes (ALTERMAN, 1992). LORENZI & GEFFERY (1987) relatam que esta planta ocorre na costa leste e nas regiões sul e sudeste

dos Estados Unidos. Comporta-se como uma planta daninha anual de verão, alcançando entre 40 e 90 cm de altura e florescendo de maio a setembro. KISSMANN & GROTH (1992) afirmam que esta planta teve origem na América tropical e possui maior presença na América do Sul. Infesta a costa oeste do continente africano e a península ibérica na Europa. É usada na alimentação, como verdura na África, como ingrediente na produção de bebidas nas Filipinas e como medicinal em várias partes do mundo, possuindo ação estimulante, desobstruente, anti-escorbútica, odontálgica, anti-disentérica e vermífuga. Causa prejuízos à cultura da soja, onde pode reduzir em até 30% a produção. Para AREVALO *et alii* (1991) o dano é função do período de convivência e da densidade da planta daninha. O aumento na densidade afetou significativamente a soja, reduzindo o peso epígeo das plantas e a produção de vagens e sementes.

LEITÃO FILHO *et alii* (1975) descreve a planta como anual ereta, herbácea e com porte entre 30 e 120 cm. As inflorescências são terminais em forma de capítulo, isolados ou formando panículas, longo-pedunculados e multifloros. O involúcro é campanulado, com brácteas externas foliáceas e internas paliáceas. As flores são amarelas, sendo as marginais de corola ligulada femininas ou hermafroditas e as centrais hermafroditas. DE MARINIS (1982) estudou a organização do capítulo, observando o fenômeno da heterocarpia com grande variabilidade no tamanho e comprimento dos aquênios. A orientação radial dos aquênios em relação ao receptáculo mostra vários ângulos de inserção. Quanto ao comprimento, há um gradiente decrescendo no sentido ápice-base, acompanhado de um aumento de espessura. Aquênios basais são curtos e

longos, com forma e orientação diferente de todos os demais. São denominados braquicarpos, sendo de difícil remoção e apresentando pouca ou nenhuma germinação nos testes de laboratório realizados. É uma planta cujo ciclo reprodutivo pode repetir-se várias vezes por ano (ARANHA *et alii*, 1988). LORENZI (1991) afirma que uma planta pode produzir entre 3.000 e 6.000 aquênios.

ANDERSEN (1968) cita trabalhos mostrando que a germinação de sementes plantadas 1 semana após a colheita foi de 35%. Sementes velhas, com 3 a 5 anos, germinaram com índice de 80%, em testes de laboratório, porém tiveram maior dificuldade para estabelecerem plântulas em casa-de-vegetação. DE MARINIS (1978) cita casos de aparecimento de anomalias cotiledonares, como a tricotilia, onde forma-se uma simetria actinomorfa trímica, e a bifurcação, que deixa um cotilédone mais curto e mais largo que o seu parceiro, apresentando 2 lóbulos divergentes e assimétricos, em lugar do limbo normal único, inteiro e lanceolado. No relato de TAMASHIRO & LEITÃO FILHO (1978), aquênios foram coletados à intervalos mensais, sendo semeados de forma sucessiva e acumulativa em condições de campo e laboratório. Observaram um gradual aumento na germinação durante o período de armazenamento. Quanto aos meses de semeadura, verificaram que a altura da planta e o início do florescimento estão diretamente correlacionados com o mês de semeadura dos aquênios. Para plantas de *Bidens gardneri*, FELIPPE (1978b) observou que as sementes das margens dos capítulos são curtas e dormentes sob luz branca e as do centro são longas e menos dormentes. A remoção do tegumento reduz a

dormência. Por outro lado, sementes recém coletadas não germinaram no escuro. Há uma correlação positiva entre o número de sementes que germinam no escuro e o tempo de armazenamento. O mesmo autor (FELIPPE, 1978a), para *Bidens pilosa* L., mostrou que a unidade de dispersão apresenta uma viabilidade bastante alta, exibindo dormência no escuro dependente da localização na planta-mãe. A germinação necessita da exposição aos comprimentos de onda azul-verde-vermelho-vermelho extremo e a embebição das sementes melhorou o efeito do choque de luz. Já a dormência no escuro é dependente do envoltório. No escuro, temperaturas alternadas de 25 e 15 °C, um choque de temperatura baixa e tratamento com ácido giberélico (400 mg.L⁻¹) podem eliminar a dormência.

Quanto à sensibilidade ao fotoperíodo KIRSZENZAFIT (1975), mostra que o fotoperíodo longo de 16 horas favorece o crescimento em altura, a expansão dos entre-nós e o aumento no tamanho das folhas. Já a formação de ramos laterais foi incentivada pelo fotoperíodo de 8 horas, havendo atraso no desenvolvimento do eixo principal. O estudo do efeito de reguladores de crescimento, revelou que o ácido giberélico (GA₃) tem um efeito promotor no crescimento em um fotoperíodo de 8 horas e provoca alteração no tipo de folhas (KIRSZENZAFIT & VÁLIO, 1976). Quanto aos ramos laterais, o fotoperíodo de 8 horas teve efeito na promoção, efeito este dependente de sua duração incidindo sobre as folhas (KIRSZENZAFIT & VÁLIO, 1977). Estes dados são confirmados por FELIPPE (1978a) que diz ser o picão-preto (*Bidens pilosa* L.) uma planta de dias curtos, cujo fotoperíodo crítico é 15 horas, dentro de um período indutor mínimo de 14 a 18 dias. O estágio mais jovem para a indução floral é o do terceiro

par de folhas. O ácido giberélico, em plantas adultas, inibe o florescimento e os fotoperíodos longos promovem maior velocidade no aparecimento de folhas e de crescimento dos entre-nós.

PICOLLO & DE MARINIS (1980) mostram que o *Bidens pilosa* L. possui um conteúdo de água entre 86 e 87% de seu peso de matéria fresca, determinado em condições de cultivo livre. Nestas condições, as plântulas apresentam superfícies evaporantes e índices de área foliar bem menores que as plantas cultivadas em câmara de vegetação. Para o cultivo, visando-se a obtenção de plantas adultas, um melhor desenvolvimento é alcançado com o uso de vasos com 1.800 mL de volume, segundo RODELLA *et alii* (1988). Já a faixa de tolerância de pH desta planta é ampla, porém o melhor desenvolvimento é auferido com pH entre 5,0 e 7,0 (OBARA *et alii*, 1991). Outra forma de produção de plantas para estudos biológicos é através da cultura de tecidos. MATSUMOTO *et alii* (1991). recomendam o uso da solução salina de Murashige & Skoog, com adição de vitaminas e sacarose, em meio de ágar a pH 5,8. São necessários os reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, BA e cinetina, para promover a organogênese e a diferenciação nos diversos tipos de explantes passíveis de uso.

Segundo RODRIGUES & ALMEIDA (1995), o picão-preto é eficientemente controlado pelos herbicidas imazethapyr, imazaquin, chlorimuron-etil, metsulfuron-metil, nicosulfuron, flumetsulan, sulfentrazone, bentazon, lactofen, fomesafen, acifluorfen e muitos outros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local dos experimentos

3.1.1. Fase experimental em casa-de-vegetação

Foram conduzidos experimentos em casa-de-vegetação, visando a obtenção de curvas de dose-resposta e estabelecer alternativas de controle com herbicidas para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., no Departamento de Horticultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e no Centro de Pesquisas Agronômicas da Cyanamid Química do Brasil, localizados, respectivamente, nos municípios de Piracicaba e Iracemápolis, no Estado de São Paulo.

3.1.2. Fase experimental em laboratório

Extratos de plantas de picão-preto, *Bidens pilosa* L., foram submetidos a análises laboratoriais no Centro de Biotecnologia Agrícola, ESALQ/USP e no Centro de Pesquisas em Agricultura da American Cyanamid Company, localizado em Princeton, Estado de New Jersey, Estados Unidos da América.

3.2. Plantas daninhas

Plantas de cinco populações de picão-preto, *Bidens pilosa* L., foram coletadas em áreas dos municípios de São Gabriel D'Oeste, Estado de Mato Grosso do Sul, Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, e de Piracicaba, Estado de São Paulo. As duas primeiras áreas vinham recebendo, por anos seguidos, aplicações de herbicidas do grupo dos inibidores da enzima ALS, para o controle de plantas daninhas na cultura da soja. Nas últimas safras, entretanto, vários escapes da referida planta daninha foram observados nestas áreas, suspeitando-se da ocorrência de resistência.

As plantas oriundas de sementes das populações descritas foram identificadas como pertencentes à espécie *Bidens pilosa* L. pelo Departamento de Botânica da ESALQ/USP e pelo Departamento de Biociências da Universidade de São Paulo. Para efeito do trabalho, as populações foram

codificadas como : R1 e R2 - duas populações coletadas em áreas distintas de São Gabriel D'Oeste (MS); R3 - população coletada em área de Passo Fundo (RS); S1 - população cujas sementes foram colhidas em área de São Gabriel D'Oeste, onde o histórico local revela que nunca foram aplicados herbicidas e; S2 - sementes colhidas no município de Piracicaba, em área do Departamento de Horticultura da ESALQ/USP, que igualmente nunca recebeu aplicações de herbicidas incluídos entre os inibidores da enzima ALS. A área de coleta da população R1 recebeu, durante sete anos seguidos, aplicações do herbicida imazaquin, inibidor da enzima ALS, para o controle de plantas daninhas na cultura da soja. A área de coleta da população R2 era próxima e vinha sendo tratada há oito anos com o mesmo herbicida. Quanto a área de coleta da população R3, embora o uso de herbicidas fosse frequente, não foi possível obter uma informação exata do seu histórico.

Este material foi acondicionado em recipientes adequados e armazenado em câmaras refrigeradas e com controle da umidade. Isto possibilitou a preservação das sementes, mantendo o seu poder germinativo em bom nível durante todo o período dos experimentos.

3.3 Substrato

Para o cultivo das plantas, preparou-se um substrato composto por três partes de terra para uma parte de húmus. A composição da terra, do húmus

e da mistura com relação a macro e alguns micronutrientes, bem como as análises granulométricas, realizadas no Laboratório Agrônomo Lagro, localizado no município de Campinas, Estado de São Paulo, estão descritas nas Tabelas 1 e 2. O substrato foi tratado com brometo de metila para eliminar contaminantes que pudessem interferir com os objetivos do estudo.

3.4 Avaliação da sensibilidade de cinco populações de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS, através de curvas de dose-resposta.

3.4.1. Semeadura e obtenção das plantas

As plantas foram obtidas através do plantio das sementes coletadas nas áreas descritas em vasos plásticos. Estes possuíam um volume de 0,3 L e foram preenchidos pelo substrato preparado para o cultivo das plantas daninhas. Foram colocadas sementes em excesso e, após o pleno estabelecimento, quando as plantas estavam completamente emergidas, efetuou-se o raleio, deixando-se quatro plântulas por vaso. Procedeu-se uma seleção visual, procurando-se deixar plantas saudáveis e uniformes, tentando-se, assim, minimizar possíveis interferências devidas à heterogeneidade do material. Foram semeados vasos adicionais para a eventual necessidade de nova seleção quando do momento da aplicação dos tratamentos com

Tabela 1 - Análise química de macro e alguns micronutrientes presentes nas amostras de terra, húmus e na mistura de terra com húmus, empregadas nos experimentos de casa-de-vegetação.

Amostra	pH		%	ppm		P (ppm)	
	CaCl ₂	H ₂ O		S	Na	*	**
Terra	4,5	5,2	0,3	10,5	5	1,3	2,3
Terra c/ húmus	5,8	6,4	1,4	20,7	56	73,2	138,6
Húmus	5,4	6,1	8,2	46	410	93	164,2

Amostra	MEq.100 mL ⁻¹ TFSA						
	K	Ca	Mg	Al	H	CTC	V%
Terra	0,06	0,5	0,2	0,2	4,5	5,5	13,9
Terra c/ húmus	0,69	5,5	1,3	-	1,6	9,1	82,4
Húmus	4,48	16	2	-	1,8	26,1	86,3

Amostra	Micronutrientes (ppm)				
	Fe	Mn	Cu	Zn	B
Terra	187	15,9	4,5	1,6	0,1
Terra c/ húmus	53,1	81	6,8	16	0,2
Húmus	7,8	207,4	2,4	40,6	0,5

Obs.: * P res; ** H₂SO₄

Tabela 2 - Análises granulométricas das amostras de terra, húmus e da mistura de terra com húmus, empregadas nos experimentos de casa-de-vegetação.

Amostra	Composição Granulométrica (%)				
	Areias				
	Grossa	Fina	Limo	Argila	Cascalho
Terra	3,1	44,9	17,2	34,8	0
Terra c/ húmus	5,5	41,4	19,7	33,4	0
Húmus	17,2	71,4	9,6	1,8	0

Amostra	Densidades		Porosi- dade	Classe	Sub-classe
	Aparente	Real			
Terra	1,02	2,06	50,76	Limo areno barrento	Fino areno barrento
Terra c/ húmus	1,06	2,11	49,88	Limo areno barrento	Fino areno barrento
Húmus	1,21	2,17	44,56	Limo arenoso	Fino arenoso

herbicidas. Este roteiro foi repetido para as cinco populações em estudo.

3.4.2. Aplicação dos herbicidas

Foi utilizada uma câmara de aplicação fechada, especialmente construída para este fim. O equipamento é acionado por um motor elétrico que, através de um sistema de correntes dentadas, movimenta a ponta de pulverização em velocidade constante. O depósito com a formulação de campo é vedado e acoplado a um compressor o qual injeta ar comprimido no sistema, sendo este o veículo propelente da calda de pulverização. A ponta de pulverização é montada com um bico leque modelo TeeJet 8003E, trabalhando a 50 cm da superfície alvo. O consumo de calda situou-se em 300 l/ha a uma pressão de 40 lb.pol⁻². Com o uso deste equipamento procurou-se alcançar uma qualidade ótima para a veiculação dos herbicidas. Assim a pulverização foi feita uniformemente sobre a superfície das plantas de picão-preto.

3.4.3. Tratamentos

Para o estabelecimento das curvas de dose-resposta, foram escolhidos quatro herbicidas pertencentes ao grupo dos inibidores da enzima ALS, utilizados em algumas das principais culturas anuais presentes no Brasil. Desta forma, foram escolhidas três sulfoniluréias, utilizadas nas culturas da soja,

arroz, trigo e milho, e uma imidazolinona de uso para aplicações em pós-emergência na cultura da soja. Resumidamente, as principais características destes herbicidas, segundo RODRIGUES & ALMEIDA (1995), são as seguintes:

a) chlorimuron-etil - grupo da sulfoniluréias.

* nome químico - etil 2-((((4-cloro-6-metoxi-pirimidina-1)-amino)-carbonil)-amino)sulfonil)benzoato.

Registrado no Brasil para uso na cultura da soja, este herbicida pode ser absorvido tanto pelas raízes quanto pelas folhas, translocando-se pelo xilema e pelo floema, possuindo movimentação por toda a planta. A toxicidade é bastante baixa e seu DL_{50} é maior que 4120 mg do ingrediente ativo por kg de peso vivo de ratos. A formulação empregada foi a de grânulos dispersíveis em água, contendo 250 g do ingrediente ativo por kg do produto comercial.

b) metsulfuron-metil - grupo das sulfoniluréias.

* nome químico - metil 2-((((4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)-carbonil)-amino)sulfonil)benzoato.

É registrado no Brasil para o controle de plantas daninhas de folhas largas nas culturas do trigo e do arroz. É um produto sistêmico, absorvido pelas folhas e raízes, translocando-se tanto pelo floema quanto pelo xilema. É empregado em doses bastante baixas, entre 2,0 e 4,0 g do ingrediente ativo por hectare. A toxicidade oral para ratos revela um DL_{50} superior a 5000 mg da formulação por kg de peso vivo. Foi utilizada a formulação de grânulos

dispersíveis em água, contendo 600 g do ingrediente ativo por kg do produto formulado.

c) imazethapyr - grupo químico das imidazolinonas.

* nome químico - ácido 2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-ilo]-5-etil-3-piridinacarboxílico.

Registrado para uso na cultura da soja, tem absorção radicular e foliar, sendo translocado tanto pelo xilema quanto pelo floema. Acumula-se nos pontos de crescimento, provocando necrose. A DL_{50} oral para ratos do ingrediente ativo é maior que 5000 mg por kg do peso vivo. A formulação utilizada no experimento foi uma solução aquosa e continha 100 g por litro do ingrediente ativo.

d) nicosulfuron - grupo das sulfoniluréias.

* nome químico - 2-(4,6-dimetoxipirimidina-2-il-carbamoilsulfamoil)-N,N-dimetilnicotinamida.

Seu emprego principal é na cultura do milho. Possui absorção foliar e radicular, sendo rapidamente translocado, tanto pelo floema quanto pelo xilema, até os meristemas apicais. O ingrediente ativo apresenta toxicidade oral para ratos superior a 5000 mg por kg de peso vivo. A formulação aplicada foi uma suspensão concentrada, contendo 40 g do ingrediente ativo por litro do produto comercial.

O preparo das doses foi feito através de diluições sucessivas, partindo-se da dose mais elevada para as doses menores. Foram empregadas 8-

doses de cada herbicida, aplicando-se a dose normalmente recomendada para o controle de plantas daninhas a nível de campo, alguns múltiplos e submúltiplos. Foram mantidas testemunhas de todos os biotipos. Os tratamentos e as respectivas doses estão na Tabela 3.

3.4.4. Avaliações

Aos 7 e 14 dias após a aplicação foram atribuídas notas de controle às parcelas, com base em uma escala percentual visual, onde zero representa nenhum controle e 100% controle total. Aos 16 dias após a aplicação, a parte aérea das plantas de picão-preto foram colhidas e, imediatamente, determinou-se a produção de fitomassa verde por parcela através de pesagem em uma balança eletrônica com precisão para 0,01 g. Após secagem em estufa até peso constante, aferiu-se, também, o peso da fitomassa seca. As plantas foram colhidas mediante o corte das plantas rente ao solo com uma tesoura. Nas parcelas onde a morte foi total, procurou-se recolher todos os restos vegetais presentes, pertencentes às plântulas de picão-preto. Assim, todas as parcelas apresentaram valores mensuráveis, uma vez que a aplicação foi feita em pós-emergência e as plantas já apresentavam alguma massa. Logicamente, a

Tabela 3 - Herbicidas e concentrações utilizadas para o estabelecimento de curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L.

Herbicida		Dose (g i.a./ha) *	Herbicida		Dose (g i.a./ha)
1	Testemunha	-	1	Testemunha	-
2	chlorimuron-etil	0,75	2	imazethapyr	4,00
3	chlorimuron-etil	1,50	3	imazethapyr	8,00
4	chlorimuron-etil	7,50	4	imazethapyr	40,00
5	chlorimuron-etil	15,00	5	imazethapyr	80,00
6	chlorimuron-etil	75,00	6	imazethapyr	400,00
7	chlorimuron-etil	150,00	7	imazethapyr	800,00
8	chlorimuron-etil	750,00	8	imazethapyr	4000,00
9	chlorimuron-etil	1500,00	9	imazethapyr	8000,00

Herbicida		Dose (g i.a./ha)	Herbicida		Dose (g i.a./ha)
1	Testemunha	-	1	Testemunha	-
2	metsulfuron-metil	0,15	2	nicosulfuron	0,60
3	metsulfuron-metil	0,30	3	nicosulfuron	1,20
4	metsulfuron-metil	1,50	4	nicosulfuron	6,00
5	metsulfuron-metil	3,00	5	nicosulfuron	12,00
6	metsulfuron-metil	15,00	6	nicosulfuron	60,00
7	metsulfuron-metil	30,00	7	nicosulfuron	120,00
8	metsulfuron-metil	150,00	8	nicosulfuron	600,00
9	metsulfuron-metil	300,00	9	nicosulfuron	1200,00

* (g i.a./ha) = gramas de ingrediente ativo por hectare

interrupção na produção de fitomassa deu-se na proporção da dose e da bioatividade dos herbicidas empregados.

3.4.5. Análise dos resultados e estabelecimento das curvas de dose-resposta

As parcelas foram dispostas em um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Os resultados foram submetidos a análise estatística através do Teste F e da regressão linear e quadrática. Cada conjunto de dados foi caracterizado em função da análise de regressão que melhor caracterizava o comportamento das variáveis dependentes em função do efeito dos tratamentos com herbicidas. As variáveis medidas foram : porcentagem de controle aos 7 dias após a aplicação, porcentagem de controle aos 14 dias após a aplicação, produção de fitomassa verde e produção de fitomassa seca. Para efeito de análise complementar, as produções de fitomassa verde e seca foram convertidas em porcentagens em relação às testemunhas. Obteve-se, a partir desta conversão, novas variáveis dependentes, cuja interpretação torna-se interessante ao nível de compreensão dos fenômenos observados.

As doses dos herbicidas foram logaritmizadas, procurando-se organizar os resultados em gráficos de fácil visualização. Utilizou-se o logaritmo natural, na base e, para esta transformação. Todas as equações de regressão

foram calculadas com base no logaritmo das doses. Para a estimativa da dose em g do ingrediente ativo por ha, empregou-se a operação inversa, ou seja, o anti-log, para o cálculo.

Para os dados advindos dos biotipos resistentes, empregou-se regressão linear e para os dados dos biotipos suscetíveis regressão quadrática, pois foram estas as tendências de comportamento dos dados. Como para todas as variáveis medidas o comportamento foi semelhante, são apresentados os gráficos apenas para as variáveis : peso da fitomassa verde, peso da fitomassa seca, porcentagem de produção de fitomassa verde em relação à testemunha e porcentagem de fitomassa seca em relação à testemunha.

A comparação das respostas das diferentes populações à ação das doses dos herbicidas foi procedida utilizando-se como parâmetro o GR_{50} ("Growth Reduction" 50%) ou a dose que provoca 50% de redução no crescimento. A partir das equações e gráficos, foram estimados os valores correspondentes à 50% de redução na variável resposta, porcentagem de produção de biomassa verde e seca em relação à testemunha. Com isto chegou-se a um valor calculado representativo da dose estimada para a obtenção do efeito de redução em 50% em cada variável dependente analisada. Também foram comparados os efeitos observados e calculados, através das equações de regressão, para as doses normalmente utilizadas para o controle de plantas daninhas na cultura da soja a nível de campo. Foram desenhadas tabelas para a análise destes parâmetros.

Todos estes procedimentos matemáticos foram realizados com o auxílio do pacote computacional SAS, "Statistical Analysis System - SAS - Institute Inc.", pertencente ao Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP, de acordo com DIAS (1995).

3.5. Ensaio de extração da enzima ALS de cinco populações de *Bidens pilosa* L. e bioensaios "in vitro" para a determinação de sua bioatividade na presença de herbicidas inibidores

A metodologia empregada foi baseada em várias publicações, observando-se as necessárias adaptações para as condições deste trabalho. As referências mais importantes são os artigos de : PRIMIANI *et alii* (1990), SAARI *et alii* (1990), SMITH *et alii* (1990), SAARI *et alii* (1992) e SINGH *et alii* (1988a). Da mesma forma, alguns métodos bioquímicos foram extraídos de COOPER (1977).

A base do método fundamenta-se nas seguintes reações :

Conforme pode ser observado, o substrato é o piruvato que, na presença da enzima ALS e dos, irá produzir acetolactato. A reação inicial é então paralisada com ácido forte que, ao mesmo tempo, converte o acetolactato em acetoína. Na reação entre creatina e naftol em hidróxido de sódio, forma-se um complexo colorido, que é quantificado em função da densidade ótica deste complexo a 530 nm, de acordo com o método de WESTERFELD (1945). A concentração de acetoína formada é proporcional a densidade ótica da solução. Em resumo, a reação colorimétrica indica a atividade da enzima na ausência e na presença de diferentes concentrações dos herbicidas inibidores. Quanto maior a quantidade de acetoína, maior será a atividade da enzima e mais intensa será a cor desenvolvida, proporcionando valores maiores nas leituras de absorbância.

3.5.1. Produção do material vegetal

Sementes das cinco populações de picão-preto foram semeadas em bandejas plásticas contendo o substrato descrito. Após a germinação e emergência, realizou-se o transplante das plântulas para outras bandejas de forma a permitir o pleno desenvolvimento.

O material para análise constituiu-se, em uma primeira etapa, de plantas inteiras, com cerca de 20 cm de altura. Posteriormente, optou-se por trabalhar apenas com os pontos de crescimento, regiões onde há maior atividade da enzima ALS. As plantas eram cortadas manualmente, lavadas e acondicionadas imediatamente em banho de gelo, visando-se evitar perdas demasiadas de material ativo. A seguir, as amostras foram enviadas ao laboratório para a efetuação das análises.

3.5.2. Extração da enzima

A extração foi feita tomando-se 50 g de folhas colhidas de plantas inteiras, lavadas e congeladas em N₂ líquido, tornando-as crocantes. O material foi triturado por 15 minutos em liquidificador, em presença de solução tampão fosfato 0,1 M pH = 7,0, 0,5 mM de cloreto de magnésio, 1 mM de piruvato de sódio, 0,5 mM de tiamina pirofosfato (TPP), 10 µM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), 10% v/v de glicerol, 1 mM de ditioneitol, 5% (p/v)

polivilpolipirolidona (PVPP) e antiespumante. A proporção de solução tampão para o volume de material foi de 4:1, ou seja 200 mL de solução para 50 g de material vegetal.

Após o homogeneizado ter sido filtrado em quatro camadas de tecido de algodão e medido o volume, foi retirada uma alíquota de 100 mL. A esta alíquota foi adicionado lentamente, em agitação e a frio, sulfato de amônio até obter-se a concentração de 13,4%. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 12.200Xg por 30 minutos. Ao sobrenadante foi, novamente e similarmente, adicionado mais 14,6 % de sulfato de amônio. As proteínas precipitadas foram separadas por centrifugação a 12.200Xg, repetindo-se a operação anterior. O precipitado protéico foi ressuspenso em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, na proporção de 5 mL por cada 100g de tecido vegetal presente no extrato. Esta marcha de procedimento está descrita na Figura 1.

Amostras que não foram submetidas ao bioensaio no mesmo dia, foram congeladas à temperatura de menos 70 °C. Normalmente, as análises foram iniciadas logo pela manhã, de forma a permitir a realização das leituras no mesmo dia, evitando-se a necessidade deste congelamento.

Figura 1 : Marcha de extração da enzima ALS de cinco populações de *Bidens pilosa* L.

3.5.3. Preparo das diluições dos herbicidas.

Cerca de 2 mg dos herbicidas chlorimuron-etil e imazethapyr na forma do produto técnico foram dissolvidos, cada um, em 2 mL de tetrahidrofuran (THF). Esta solução inicial apresentava-se na concentração de 1.000 ppm, e foi o ponto de partida das diluições sucessivas para a montagem das baterias de tubos de ensaio com diferentes concentrações dos herbicidas. Tomou-se uma alíquota de 50 μ L e secou-se com nitrogênio líquido. O resíduo foi eluído com 5 mL de solução tampão fosfato 0,05 mM, pH 7,5, proporcionando a concentração de 10.000 ppb. Esta mistura foi agitada mecanicamente por uma hora. A partir desta solução estoque, foram preparadas duas séries de diluição : para as imidazolinonas - 10.000, 3.000, 1.000, 300, 100, 30 e 10 ppb; e para as sulfoniluréias - 3.000, 1.000, 300, 100, 30, 3 e 1 ppb. Em alíquota correspondente à nova diluição completava-se o volume com solução tampão até 5 mL. Este roteiro de preparação está descrito na Figura 2.

Figura 2 : Roteiro para preparo das diluições dos herbicidas a partir do ingrediente ativo purificado.

3.5.4. Dessalinização da enzima

Quando durante o preparo do extrato o material foi congelado em presença de sulfato de amônio, tornou-se necessário a adição de mais solução tampão, para ressuspender o precipitado, filtrá-lo e centrifugá-lo a 12.200Xg por 15 minutos.

Em seguida o precipitado protéico foi ressuspenso em solução tampão fosfato, na proporção de 2mL/ 5g de tecido, e dessalinizado utilizando-se a coluna de Sephadex (G25-300) de 16 mL (aproximadamente 15x100 mm) equilibrada com o tampão de extração. Após a adição do extrato foram descartados os primeiros 2,5 mL e a porção contendo a enzima (4 mL) foi então coletada. Este processo está esquematicamente representado na Figura 3.

Extratos que não sofriam congelamento eram imediatamente aplicados à coluna de Sephadex.

Para preparar a coluna Sephadex
(G25 - 300 - vol 16 mL $\rightarrow$ $\approx$ 1 g / mL)

A produção é de 3,5 mL da solução de enzimas / 5 g de extrato

Figura 3: Marcha para dessalinização da enzima ALS, tanto pelo método direto quanto para análise de amostras congeladas.

3.5.5. Bioensaio “in vitro” com a enzima ALS

A mistura de reação continha 3,5 μL de uma solução composta de: 5,6 mL de água destilada; 2,0 mL de uma solução tampão KH_2PO_4 0,2 M pH 7,0; 2,0 mL de uma solução tampão fosfato contendo 12 mg de tiamina pirofosfato e 2,0 mL de uma solução de MgCl_2 5 mM. À mistura de reação foram adicionados 50 μL da apropriada diluição dos herbicidas e 100 μL de enzima dessalinizada. Ao controle foram adicionados, em substituição ao herbicida, 50 μL de uma solução de H_2SO_4 3 M, visando impedir qualquer possibilidade de reação, constituindo-se no controle zero, cujos valores de leitura foram descontados das leituras dos tratamentos. A reação que durou 60 minutos para as imidazolinonas e 30 minutos para as sulfoniluréias, à 30 °C, iniciou-se com a adição da enzima. Findo este tempo, a reação foi interrompida com a adição de 50 μL por tubo de H_2SO_4 3 M. Procedeu-se, então, a um segundo período de incubação de 15 minutos à 60 °C, para a formação de acetoína, na reação do ácido com o acetolactato possivelmente presente. O complexo colorido é formado com a adição de 500 μL de uma solução contendo 0,5 mg de creatina em 100 mL de água destilada e 500 μL de uma outra solução contendo 1 g de naftol em 20 mL de NaOH 2,5 N. É importante observar que estes dois últimos reagentes devem ser preparados no momento de adição ao processo. Esta mistura é novamente incubada por 15 minutos à 60 °C, para o desenvolvimento da cor que, no caso, variou do levemente rosa até o vermelho, contrastando

com a cor marrom-esverdeada do extrato. Após o resfriamento à temperatura ambiente por 10 minutos, as densidades óticas foram lidas em espectrofotômetro a 530 nm (Figura 4).

O procedimento experimental com o uso do espectrofotômetro necessita um acurado planejamento, já que apresenta rendimento baixo. Posteriormente, o uso de microplacas e espectrofotômetros desenvolvidos para elas, possibilitou um maior rendimento nas análises.

3.5.6. Método simplificado

O mesmo procedimento experimental descrito acima, para bioensaio *in vitro* da enzima, pode ser realizado de forma mais rápida e precisa, com o uso de aparelhos e equipamentos laboratoriais mais adequados. Assim, o planejamento do método para o trabalho com microplacas contendo 12 X 8 micro-recipientes ou furos permitiu expressivos ganhos operacionais e qualitativos nas análises.

Figura 4 : Roteiro para a realização de bioensaios “in vitro” com a enzima ALS.

Basicamente, esta fase experimental iniciou-se da mesma forma, com a produção do material vegetal. Pontos de crescimento foram colhidos e acondicionados em tubos plásticos e mantidos em gelo triturado. Determinou-se o peso de biomassa fresca. Utilizando-se almofariz, adicionou-se N_2 líquido. O material vegetal assumiu, então, o aspecto rígido e crocante, sendo rapidamente triturado até o ponto de pó. Em seguida, o material vegetal foi homogeneizado em uma solução tampão contendo : 5 mL de solução tampão de KH_2PO_4 1 M, pH 7,0; 1 mL de $MgCl_2$ 1 M; 50 mg de uma mistura contendo 49:1 (p:p) de TPP/FAD; 1,1 g de piruvato de sódio; e o volume completado à 50 mL. Esta solução foi empregada em todo o processo e apresenta, basicamente, a mesma composição dos reagentes descritos anteriormente no item 3.5.5. A adição desta solução foi feita sem que ocorra o congelamento da mesma, em contato com o pó do material vegetal. Filtrou-se a mistura em malha de polietileno bastante fina, de forma a eliminar-se todo o resíduo grosseiro.

O extrato filtrado foi centrifugado à 15.000Xg por 15 minutos, mantendo-se sempre a temperatura entre 0 e 4 °C. Descartou-se o precipitado e o sobrenadante foi dessalinizado em coluna de Sephadex. Estas colunas foram adquiridas prontas, já possuindo um pH fisiológico e equilibradas com solução tampão. Cerca de 3 mL do extrato centrifugado foi adicionados à coluna, a qual foi, em seguida, lavada com 4 mL da solução tampão e o eluído coletado. A produção foi 4 mL de extrato de enzima dessalinizada.

Os herbicidas empregados, imazethapyr, chlorimuron-etil, pirimidiloxibenzoato (POB) e flumetsulan, pertencem a quatro diferentes grupos químicos que, no entanto, possuem o mesmo mecanismo de ação na inibição da atividade da enzima ALS. A partir de soluções estoques contendo 100 mM dos herbicidas, por diluições sucessivas, chegou-se às concentrações de transferência para os furos iniciais das microplacas. Apenas o herbicida imazethapyr foi transferido diretamente da solução estoque pois as concentrações utilizadas no estudo foram de ordem μM , ao passo que para os demais herbicidas as concentrações foram de ordem nM. Tomando-se o exemplo do imazethapyr, transferiu-se uma alíquota de 40 μL da solução estoque 100 mM para o primeiro furo da microplaca adicionando-se 160 μL de água destilada, chegando-se a um volume de 200 μL e uma concentração de 200 μM . Através de micropipetas de volume regulável e pontas múltiplas, diretamente na microplaca, foram feitas diluições sucessivas, transferindo-se 100 μL desta primeira série de furos para a série de furos adjacente, já preenchidas com 100 μL de água destilada, e assim sucessivamente, até serem atingidas as seguintes concentrações : 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 μM . Da última série de furos, retirou-se 100 μL que foram excluídos. Para os demais herbicidas, os procedimentos foram similares, havendo a necessidade de pré-diluições de 10 vezes em tubos de ensaio antes da introdução no primeiro furo da microplaca, para o estabelecimento de uma solução inicial de

100 nM. As concentrações para os herbicidas chlorimuron-etil, POB e flumetsulam foram: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 nM.

A microplaca possuía 8 linhas de furos e 12 colunas. No total foram empregadas 3 colunas e 7 linhas, representando cada linha uma diluição, para cada herbicida. Cada coluna, na mesma linha representava uma repetição da mesma concentração do herbicida. A última linha foi reservada para os tratamentos controles. Todos os 12 furos desta linha receberam apenas água destilada e solução contendo enzima. Após a reação, 4 furos receberam KOH, não formando acetoína, e 8 furos receberam H_2SO_4 , para a interrupção da reação e formação de acetoína. Estes controles são chamados de cor zero e cor total, servindo ao ajuste das leituras feitas no espectrofotômetro.

Preparadas as microplacas, foi adicionado 100 μL de extrato de enzima dessalinizada a cada um dos furos. As microplacas foram incubadas à temperatura de 37 ° C por 3 horas. Após este tempo, transferiu-se uma alíquota de 100 μL de cada furo para uma nova microplaca, onde a reação foi interrompida com a adição de 25 μL de H_2SO_4 à 5%. Os 4 furos cor zero receberam 25 μL de KOH 5%. Após novo período de incubação de 15 minutos à 60 ° C, foram adicionados 100 μL de solução de creatina (50 mg de creatina/ 10 mL de água destilada) e 100 μL de solução de naftol (500 mg de naftol/ 10 mL de solução NaOH 4 N). Procedeu-se nova incubação por 15 minutos à 60 ° C, para o desenvolvimento de cor. Após o esfriamento, a temperatura ambiente,

realizou-se a leitura da densidade ótica à 530 nm. Estes procedimentos estão esquematizados na Figura 5.

3.5.7. Análise dos resultados e estabelecimento de curvas de dose-resposta para a inibição da enzima

De todas as leituras foram subtraídos os valores de leituras relativos ao controle cor zero. A seguir, com o uso do controle cor total, correspondente à reação total sem inibidores, foram calculadas as porcentagens de inibição da atividade da enzima para todos os tubos ou furos, considerados parcelas. Para cada diluição existiram 3 repetições. Estes dados foram submetidos ao Teste F e à análise de regressão do primeiro grau, visando o estabelecimento de equações para serem traçadas retas representativas do comportamento da enzima diante de diversos inibidores e concentrações dos mesmos.

Para efeito de comparação entre populações e herbicidas, adotou-se o parâmetro I_{50} que significa a concentração de herbicida necessária para inibir 50% da atividade da enzima. Os valores foram estimados através das equações calculadas na análise de regressão. Todos os valores de concentrações foram logaritmizados para os cálculos bem como para o desenho dos gráficos, visando possibilitar uma boa interpretação dos resultados.

Figura 5 : Método de extração da enzima ALS para cinco populações de *Bidens pilosa* L. e bioensaio com diferentes herbicidas.

Estes procedimentos matemáticos foram realizados com o auxílio do pacote computacional SAS, “Statistical Analysis System - SAS - Institute Inc.”, pertencente ao Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP, utilizado de acordo com DIAS (1995).

3.6. Controle químico alternativo das populações de *Bidens pilosa* L. resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS.

3.6.1. Semeadura e obtenção das plantas

As plantas foram semeadas em bandejas de uso olerícola, preenchidas com o substrato descrito anteriormente. Após a germinação e emergência, quatro plântulas foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade para 1,0 L de substrato. Foram transplantados vasos em excesso, procurando-se realizar uma seleção visual para tentar alcançar maior homogeneidade do material das parcelas. No momento da aplicação foram escolhidos os vasos mais uniformes, descartando-se aqueles com problemas de pegamento ou desiguais.

Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação, recebendo irrigação automática, de forma a garantir o pleno desenvolvimento das plantas. As cinco populações cultivadas apresentaram excelente desenvolvimento vegetativo, havendo quase total pegamento das plantas após o transplante. Em

aproximadamente 16 dias, à contar da semeadura, as plantas atingiram 2 a 4 folhas definitivas, estágio recomendado para a aplicação dos herbicidas.

3.6.2. Aplicação dos herbicidas

A aplicação foi feita utilizando-se um pulverizador costal pressurizado, tendo como gás propelente o ar comprimido. A formulação de campo foi depositada em garrafas plásticas com capacidade para 2,0 L. O volume total de calda empregado foi equivalente a 200 L.ha^{-1} , sendo utilizada na pulverização uma barra manual equipada com 4 bicos TeeJet 8002E, espaçados de 0,5 m. A pressão de trabalho foi 30 lb.pol^2 .

Verificou-se uma boa deposição das gotas de pulverização sobre as parcelas/vasos, garantindo-se, assim, grande eficácia na veiculação dos herbicidas até o alvo.

3.6.3. Tratamentos

Foram escolhidos alguns herbicidas, dentre os principais, utilizados para o controle de plantas daninhas na cultura da soja. Na seleção dos produtos buscou-se identificar algumas alternativas para o controle de picão-preto resistente sem, no entanto, excluir a possibilidade de controle com outros

herbicidas, não incluídos no estudo. As principais características dos herbicidas aplicados, segundo RODRIGUES & ALMEIDA (1995), são :

a) imazethapyr - já descrito no item 3.4.3.c.

b) chlorimuron-etil - já descrito no item 3.4.3.a.

c) flumetsulam - grupo químico das triazolopirimidinas sulfonamidas.

* nome químico - N-(2,6-difluorofenil)-5-metil-(1,2,4)-triazolo-(1,5a)-pirimidina-2-sulfonamida.

É um herbicida sistêmico, absorvido pelas radículas, caulículos, cotilédones, caules e folhas. Tem translocação apo-simplástica até os meristemas . É recomendado para uso preferencial em pré-plantio-incorporado ou em pré-emergência, podendo apresentar alguma ação em pós-emergência com o uso de adjuvantes. A toxicidade oral para ratos do ingrediente ativo é superior a 5000 mg.kg^{-1} de peso vivo. A formulação empregada era uma suspensão concentrada contendo 120 g do ingrediente ativo por litro do produto comercial.

d) sulfentrazone - grupo químico das aril triazolinonas.

* nome químico - N-[2,4-dicloro-5[4-(difluorometil)-4,5dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]fenil] metanosulfonamida.

Este herbicida possui ação sistêmica e de contato. A movimentação pelo floema é pequena, devido à rápida dessecação dos tecidos. Age nas plantas por um processo de ruptura das membranas celulares. É

recomendado para o controle de plantas daninhas em pré-emergência, tendo sido desenvolvido, também, para uso em pós-emergência em doses bastante menores. A toxicidade aguda oral para ratos fêmeas é superior a 4000 mg.kg^{-1} de peso vivo, considerando-se o ingrediente ativo. A formulação usado possuía 500 g do ingrediente ativo por L do produto comercial e era uma suspensão concentrada.

e) bentazon - grupo químico das tiodiazinas.

* nome químico - 3-isopropil-2,1,3-benzotiodiazinona-(4)-2,2-dióxido.

A absorção dá-se essencialmente pelas folhas e tecidos verdes das plantas e apresenta translocação muito reduzida. É um herbicida inibidor da fotossíntese. A toxicidade do ingrediente ativo para ratos é 1100 mg.kg^{-1} de peso vivo. A formulação aplicada era uma solução aquosa contendo 600 g do ingrediente ativo por L da formulação comercial.

f) lactofen - grupo químico dos difenil-éteres.

* nome químico - 1'-(carboetoxi)-etil-5-(2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi)-2-nitrobenzoato.

Este herbicida possui absorção foliar e, com menor intensidade, radicular, apresentando translocação muito limitada. Sua atuação dá-se por contato, sendo o mecanismo de ação ainda pouco conhecido, sabendo-se que a ativação é ocasionada pela luz e há a destruição das membranas. A toxicidade do ingrediente ativo oral para ratos é superior a 5000 mg.kg^{-1} de peso vivo. A

formulação utilizada apresenta 240 g do ingrediente ativo por litro do produto comercial, tratando-se de um concentrado emulsionável.

g) fomesafen - grupo químico dos difenil-éteres.

* nome químico - 5-(2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi)-N-metilsulfonil-2-nitrobenzamida.

Possui características semelhantes ao herbicida anterior, sendo absorvido pelas folhas e, em menor escala, pelas raízes. A translocação é muito limitada pelo floema, comprometida pela rápida dessecação que provoca nos tecidos. Promove a formação de radicais, alterando o processo de fotossíntese dentro dos cloroplastos. É recomendado para a cultura da soja, provocando uma fitotoxicidade, logo após a aplicação em pós-emergência, que, contudo, é transitória, havendo recuperação da cultura. O produto comercial possui 250 g.l⁻¹ do ingrediente ativo e é formulado como solução aquosa concentrada.

h) acifluorfen - grupo químico dos difenil-éteres.

* nome químico - 5-(2-cloro-4-(trifluorometil)-fenoxi)-2-nitrobenzoato de sódio.

Este herbicida é pertencente ao mesmo grupo do dois herbicidas apresentados anteriormente, mostrando comportamento semelhante. Possui absorção foliar e, em menor escala, radicular. A movimentação nas plantas é reduzida devido ao seu mecanismo de ação, o qual provoca uma rápida destruição dos tecidos, rompimento de membranas e interferência com o transporte de elétrons tanto em cloroplastos quanto em mitocôndrios. É de 2015

mg do ingrediente ativo por kg de peso vivo em ratos, sua toxicidade oral. Utilizou-se a formulação concentrado solúvel contendo 170 g do ingrediente ativo por L do produto comercial.

Também foram incluídas algumas misturas de tanque, entre os herbicidas citados, para a verificação do efeito combinado. Em todos os tratamentos foram incluídos os adjuvantes recomendados. Todos os tratamentos e as respectivas doses empregadas estão na Tabela 4.

3.6.4 Avaliações

Foram realizadas avaliações visuais sobre a porcentagem de controle das plantas aos 7 e 14 dias após a aplicação. Utilizou-se uma escala de notas, onde 0 representava nenhum controle e 100% controle total. Aos 14 dias, as parcelas foram colhidas, cortando-se as plantas rente ao solo com uma tesoura. Foi determinada a fitomassa verde e, após secagem em estufa até peso constante, a fitomassa seca, com o uso de uma balança eletrônica com precisão de 0,01 g. Em todas as parcelas procurou-se retirar todo o material vegetal presente, inclusive o resíduo das plantas mortas. Por tratar-se de uma aplicação em pós-emergência, todas as parcelas já possuíam um certo montante de fitomassa por ocasião da aplicação.

Tabela 4 - Tratamentos utilizados para a observação do controle químico de populações de *Bidens pilosa* L.

Tratamentos		Dose g i.a./ha	P.C./ha
1	Testemunha	-	-
2	Imazethapyr	100	1,0 L
3	Chlorimuron-etil	20	80 g
4	Flumetsulan	120	1,0 L
5	Sulfentrazone	50	0,5 L
6	Bentazon	900	1,5 L
7	Lactofen	200	0,8 L
8	Fomesafen	250	1,0 L
9	Acifluorfen	255	1,5 L
10	Acifluorfen + Bentazon *	160+600	2,0 L
11	Imazethapyr + Lactofen	100+200	1,0 + 0,8 L
12	Imazethapyr + Fomesafen	100+250	1,0 + 1,0 L
13	Imazethapyr + Acifluorfen	100+255	1,0 + 1,5 L
14	Chlorimuron-etil + Lactofen	20+200	80 g + 0,8 L
15	Chlorimuron-etil + Fomesafen	20+250	80 g + 1,0 L
16	Chlorimuron-etil + Acifluorfen	20+255	80 g + 1,5 L

Obs.: * Formulação pronta

i.a. - ingrediente ativo

P.C. - produto comercial

3.6.5. Delineamento estatístico e análise dos resultados

Utilizou-se um delineamento estatístico fatorial, com 16 tratamentos, 5 populações e 3 blocos. Foi aplicado o Teste F para a identificação de diferenças entre tratamentos com herbicidas, entre tratamentos representados pelas populações e para a identificação da significância do efeito da interação entre os tratamentos com herbicidas e as populações. A seguir, foi empregado o Teste de Tukey para a comparação de médias de tratamentos com herbicidas, dentro de cada população, assim como para a comparação de médias de populações dentro de cada tratamento. Este procedimento foi adotado uma vez que o efeito da interação foi altamente significativo.

Todos os testes foram calculados ao nível de 5% de significância, utilizando o pacote computacional SANEST - Sistema de Análise Estatística, pertencente ao Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP (NOGUEIRA, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados de casa-de-vegetação - curvas de dose-resposta

Os resultados de produção de fitomassa verde e produção de fitomassa seca foram submetidos à análise de regressão linear e quadrática. Estes dados referem-se aos experimentos conduzidos em casa-de-vegetação. Cada conjunto de dados resultou em uma equação, através da estimativa dos parâmetros de ajustes feita em computador. De uma forma geral, os dados advindos de biotipos resistentes tiveram uma tendência linear, quando as curvas foram traçadas utilizando-se o logaritmo neperiano ($\ln$) da dose. O coeficiente de declividade da reta, biologicamente, reflete a proporção de diminuição na produção de fitomassa em função do aumento logarítmico da dose do herbicida (STREIBIG *et alii*, 1993).

As Figuras 6, 7, 8 e 9 representam as curvas de dose-resposta das populações resistentes e suscetíveis aos herbicidas chlorimuron-etil, metsulfuron-metil, imazethapyr e nicosulfuron quanto ao peso da fitomassa verde. Invariavelmente, as três retas referentes às três populações resistentes aparecem na porção superior de cada gráfico. Bem abaixo, posicionam-se os segmentos de parábola referentes às populações suscetíveis. No centro destes

Figura 6: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com o herbicida chlorimuron-etil - Produção média de fitomassa verde (g.parcela⁻¹)

Figura 8: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com o herbicida imazethapyr - Produção média de fitomassa verde (g.parcela⁻¹)

Figura 9: Curvas de dose-resposta para cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratados com o herbicida nicosulfuron - Produção de fitomassa verde (g . parcela⁻¹).

gráficos, está destacada uma linha que indica a porção onde tem-se 50% de redução da variável resposta. Percebe-se, que o cruzamento desta linha com as curvas correspondentes às populações resistentes ocorrem em posições cujas abscissas relacionam-se a doses significativamente maiores, em relação às populações suscetíveis. Isto reflete a comprovação de que existe uma grande diferença de sensibilidade entre as populações.

As Figuras 10, 11, 12 e 13, descrevem os mesmos dados experimentais, expressos como porcentagem de produção de fitomassa verde em relação à testemunha. Esta forma de representação permite uma idéia com mais significado, comparado ao peso isolado de plantas. Assim, pode-se notar, que a tendência dos dados é exatamente a mesma, com algumas variações devido ao método de cálculo. Cada porcentagem foi obtida a partir da média de produção de fitomassa das testemunhas da respectiva população.

Uma ressalva deve ser feita em relação ao uso da parábola para a descrição dos efeitos dos herbicidas sobre os biotipos suscetíveis. A construção das curvas foi feita eliminando-se a dose zero. Isto leva à estimativa da curva no segmento compreendido entre a menor dose e a maior dose. Entretanto, se houvesse a inclusão do valor da testemunha, tratamento dose zero, o comportamento dos dados aproximaria-se de uma curva hiperbólica. A declividade seria, então, extremamente acentuada, ocorrendo grande injúria com doses bastante baixas. Assim, as estimativas das doses GR_{50} para os biotipos suscetíveis sofrem restrições. Os coeficientes de determinação, também, são mais baixos para os biotipos suscetíveis.

Figura 10: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com chlorimuron-etil. Porcentagem média de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.

Figura 12: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com imazethapyr. Porcentagem média de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.

Figura 13: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com nicosulfuron. Porcentagem média de produção de fitomassa-verde em relação à testemunha.

A Tabela 5 apresenta as equações de regressão linear, para os biotipos resistentes, e regressão quadrática, para os biotipos suscetíveis. Através da substituição pelo valor 50% e do cálculo do anti-log do resultado, chega-se à estimativa do GR_{50} das cinco populações de *Bidens pilosa* L. para os 4 herbicidas. Nota-se que o GR_{50} para as populações resistentes são superiores em muitas vezes às estimativas, embora com as restrições descritas, do GR_{50} para as populações suscetíveis. Estes dados comprovam a grande diferença de sensibilidade entre os materiais, repetindo as observações feitas a nível de campo. Dentre os herbicidas aplicados, o imazethapyr apresentou valores mais expressivos de tolerância para as populações resistentes.

A Tabela 5, ainda, apresenta uma comparação entre o valor calculado, através das equações de regressão, para o efeito das doses normalmente usadas a nível de campo, e o valor observado referente ao tratamento onde esta dose foi efetivamente aplicada. Foram empregadas as doses normalmente aplicadas para o controle de plantas daninhas em pós-emergência, a nível de campo, nas culturas onde cada um dos herbicidas são registrados. As doses foram as seguintes : chlorimuron-etil - $15,0 \text{ g.ha}^{-1}$, metsulfuron-etil - $3,0 \text{ g.ha}^{-1}$, imazethapyr - 80 g.ha^{-1} e nicosulfuron - 12 g.ha^{-1} . A análise destes dados mostra que valores calculados e observados estão bastante próximos. Isto evidencia a precisão do método utilizado. Os valores bastante baixos de produção de fitomassa verde, determinados pelos tratamentos sobre as populações suscetíveis, comprovam o controle esperado e, normalmente, alcançado a nível de campo. Por outro lado, para todos as

Tabela 5: Equações de regressão ($Lx = Ln [Dose]$) para a porcentagem de fitomassa verde em relação à testemunha. Cálculo de GR_{50} e do efeito da dose correspondente ao tratamento de campo, para os 4 herbicidas, com-paração com o efeito observado da mesma dose.

Herbicida	População	Equação *	GR_{50} g i.a./ha	Resposta** à dose calculada	Resposta** à dose observada	Coefficiente de Determinação
Chlorimuron-etil	R1	$PMV\% = 82.331144 - 10.158622 L[DOSE]$	24,11	54,82	44,00	0,9263
	R2	$PMV\% = 87.265364 - 8.696146 L[DOSE]$	72,62	63,72	56,94	0,9218
	R3	$PMV\% = 67.407089 - 4.885274 L[DOSE]$	35,28	54,18	53,80	0,8911
	S1	$PMV\% = 39.290107 - 10.726143 L[DOSE] + 0.866962 L[DOSE]^2$	0,44	16,60	16,15	0,8105
	S2	$PMV\% = 35.726688 - 14.051753 L[DOSE] + 1.432131 L[DOSE]^2$	0,09	8,18	8,13	0,6330
Metsulfuron-metil	R1	$PMV\% = 75.802925 - 6.183625 L[DOSE]$	64,90	69,01	68,04	0,9119
	R2	$PMV\% = 80.140991 - 8.256933 L[DOSE]$	38,49	71,07	66,10	0,9312
	R3	$PMV\% = 67.742159 - 4.583068 L[DOSE]$	48,00	62,71	60,97	0,8878
	S1	$PMV\% = 19.777605 - 10.473283 L[DOSE] + 1.524473 L[DOSE]^2$	7,713E-13	10,11	10,52	0,6740
	S2	$PMV\% = 17.093283 - 9.849486 L[DOSE] + 1.525723 L[DOSE]^2$	1,2877E-12	8,11	8,09	0,6328
Imazethapyr	R1	$PMV\% = 101.810356 - 5.575036 L[DOSE]$	10864,73	77,38	79,14	0,8710
	R2	$PMV\% = 116.841248 - 7.807099 L[DOSE]$	5227,03	82,63	85,66	0,8321
	R3	$PMV\% = 122.773973 - 8.988519 L[DOSE]$	3282,38	83,39	86,40	0,8374
	S1	$PMV\% = 55.705101 - 15.459134 L[DOSE] + 1.123929 L[DOSE]^2$	1,58	9,54	8,13	0,7403
	S2	$PMV\% = 62.927626 - 19.004974 L[DOSE] + 1.423812 L[DOSE]^2$	3,72	6,99	7,14	0,6365
Nicosulfuron	R1	$PMV\% = 105.798983 - 9.451944 L[DOSE]$	366,30	82,31	87,86	0,8686
	R2	$PMV\% = 106.523960 - 10.153195 L[DOSE]$	261,68	81,29	87,87	0,7959
	R3	$PMV\% = 98.927232 - 10.631637 L[DOSE]$	99,69	72,51	67,27	0,9684
	S1	$PMV\% = 40.735515 - 9.000690 L[DOSE] + 0.882622 L[DOSE]^2$	0,59	22,58	21,40	0,8753
	S2	$PMV\% = 49.011535 - 17.146349 L[DOSE] + 1.609648 L[DOSE]^2$	0,86	16,34	14,77	0,8849

* Todas as curvas foram significativas ao nível de 5% de probabilidade.

** Porcentagem de produção de fitomassa verde.

populações resistentes, estas doses não foram capazes de controlar as plantas. Embora tenha havido redução na produção de fitomassa verde, as plantas não morreram e, em muitos casos, foram apenas sensivelmente injuriadas. A colheita das parcelas foi feita 16 dias após a aplicação, o que dá uma indicação da provável recuperação das plantas.

As mesmas considerações podem ter abrangência sobre os dados de fitomassa seca (Figuras 14, 15, 16, e 17) ou produção de fitomassa seca em relação à testemunha (Figuras 18, 19, 20 e 21). Observa-se uma maior aproximação das retas e curvas. A interrupção da produção de fitomassa deu-se em função da dose e do herbicida empregado. O exíguo tempo decorrido entre o momento da aplicação e a colheita das plantas permitiu pouco tempo para o acúmulo de matéria seca em todas as populações. Isto explica, em parte, a aproximação de curvas. Por outro lado, conclui-se que apesar disto, as populações suscetíveis tiveram uma paralisação mais abrupta, com suas curvas estando localizadas sempre abaixo das retas das populações resistentes. Os cruzamentos com a delimitação mediana, para as curvas das populações suscetíveis, é sempre mais próxima da origem que o cruzamento para as retas das populações resistentes. Consequentemente, Tabela 6, o GR_{50} calculado para as populações resistentes é superior ao GR_{50} calculado para as populações suscetíveis, comprovando-se matematicamente os dados observados. A comparação do efeito das doses utilizadas a nível de campo sobre a produção de matéria seca mostra que o tratamento que mais injuriou as populações resistentes foi o de 15 g.ha^{-1} de chlorimuron-etil. Nesta mesma

Figura 14: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratados com o herbicida chlorimuron-etil- Produção média de fitomassa seca (g.parcela⁻¹)

Figura 15: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratados com o herbicida metsulfuron-metil- Produção média de fitomassa seca (g.parcela⁻¹)

Produção média de fitomassa seca (g.parcela⁻¹)

Figura 16: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidders pilosa* L., tratados com o herbicida imazethapyr - Produção média de fitomassa seca (g.parcela⁻¹)

Figura 17: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com o herbicida nicosulfuron - Produção média de fitomassa seca (g.parcela⁻¹)

Figura 18: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com chlorimuron-etil. Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.

Figura 19: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com metsulfuron-metil. Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.

Figura 20: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com imazethapyr. Porcentagem média de produção de massa seca em relação à testemunha.

Figura 21: Curvas de dose-resposta para as cinco populações de *Bidens pilosa* L., tratadas com nicosulfuron. Porcentagem média de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.

Tabela 6: Equações de regressão ($Lx = Ln [Dose]$) para a porcentagem de fitomassa seca em relação à testemunha. Cálculo de GR_{50} e do efeito da dose correspondente ao tratamento de campo, para os 4 herbicidas, com-paração com o efeito observado da mesma dose.

Herbicida	População	Equação *	GR_{50} g i.a./ha	Resposta ** à dose calculada	Resposta ** à dose observada	Coefficiente de Determinação
Chlorimuron-etil	R1	PMS% = 94.183318 - 8.791374 L[DOSE]	152,29	70,38	60,26	0,9089
	R2	PMS% = 82.491479 - 6.389077 L[DOSE]	161,66	65,19	59,81	0,8933
	R3	PMS% = 55.007326 - 3.632857 L[DOSE]	3,97	45,17	42,51	0,8110
	S1	PMS% = 58.859358 - 3.539086 L[DOSE] - 0.269973 L[DOSE] ²	1,28	47,30	47,87	0,8114
	S2	PMS% = 55.912733 - 13.913791 L[DOSE] + 1.185970 L[DOSE] ²	1,78	26,93	26,09	0,7677
Metsulfuron-metil	R1	PMS% = 93.955146 - 7.140518 L[DOSE]	471,41	86,11	90,94	0,8599
	R2	PMS% = 80.815492 - 8.4392454 L[DOSE]	38,53	71,54	65,12	0,9236
	R3	PMS% = 60.44951 - 4.581692 L[DOSE]	9,78	55,42	50,71	0,8631
	S1	PMS% = 42.02175 - 3.987365 L[DOSE] + 0.77736 L[DOSE] ²	0,99	37,73	33,34	0,6607
	S2	PMS% = 39.261975 - 6.600778 L[DOSE] + 0.506947 L[DOSE] ²	0,61	32,62	29,57	0,7823
Imazethapyr	R1	PMS% = 116.360243 - 6.532141 L[DOSE]	25823,34	87,74	91,29	0,8533
	R2	PMS% = 102.721055 - 6.454455 L[DOSE]	3526,87	74,44	73,68	0,8427
	R3	PMS% = 101.428493 - 8.109925 L[DOSE]	567,61	65,89	68,04	0,9253
	S1	PMS% = 70.310387 - 13.328393 L[DOSE] + 0.845908 L[DOSE] ²	2,72	28,15	26,19	0,7371
	S2	PMS% = 85.348997 - 18.590683 L[DOSE] + 1.190596 L[DOSE] ²	11,35	26,75	25,86	0,7857
Nicosulfuron	R1	PMS% = 105.286178 - 5.860447 L[DOSE]	12503,72	90,72	95,16	0,7397
	R2	PMS% = 93.819140 - 7.315446 L[DOSE]	399,39	75,64	71,63	0,7652
	R3	PMS% = 80.136650 - 7.916866 L[DOSE]	45,00	60,46	51,57	0,8840
	S1	PMS% = 53.741084 - 4.643804 L[DOSE] + 0.037903 L[DOSE] ²	1,00	42,44	39,13	0,8274
	S2	PMS% = 66.526142 - 9.944215 L[DOSE] + 0.526725 L[DOSE] ²	1,53	45,07	40,91	0,9148

* Todas as curvas foram significativas ao nível de 5% de probabilidade.

** Porcentagem de produção de fitomassa seca.

direção, a população R3, encontrada na região de Passo Fundo, no Rio Grande do Sul, pareceu ser a mais sensível, em termos de produção de fitomassa seca.

As Figuras 22 e 23 ilustram o comportamentos das cinco populações de *Bidens pilosa* L. submetidas aos tratamentos com os herbicidas chlorimuron-etil, metsulfuron-metil, imazethapyr e nicosulfuron, utilizando-se as doses normalmente recomendadas para o controle desta planta daninha.

A resistência observada encaixa-se no conceito proposto por HOLT & LeBARON (1990) e WARWICK (1991) pois manifesta-se a doses normalmente utilizadas a nível de campo. A análise do histórico destas áreas admite a hipótese da seleção destes biotipos resistentes ter sido causada pelo uso contínuo de herbicidas de um mesmo mecanismo de ação, como afirma SAWICKI (1987). Como os resultados foram semelhantes tanto para as sulfoniluréias como para a imidazolinona empregada pode-se dizer que trata-se de um fenômeno de resistência cruzada, de acordo com o conceito de POWLES & HOWAT (1990).

Este aparecimento espontâneo de resistência pode estar relacionado a alterações genéticas a nível de população, resultado de genótipos que sobreviviam na população original em baixa porcentagem. Tal fato foi observado por LEE *et alii* (1988), MALLORY-SMITH *et alii* (1990) e GUTTIERI *et alii* (1992), entre outros autores, em outras populações de plantas daninhas.

Figura 22: Comportamento das cinco populações de *Bidens pilosa* L. tratadas com as doses recomendadas dos quatro herbicidas testados. Porcentagem de produção de fitomassa verde em relação à testemunha.

Figura 23: Comportamento das cinco populações de *Bidens pilosa* L. tratadas com as doses recomendadas dos quatro herbicidas testados. Porcentagem de produção de fitomassa seca em relação à testemunha.

4.2. Resultados de laboratório

Após tentativas de utilização de plantas inteiras, verificou-se que o uso de pontos de crescimento apresentavam melhores resultados, com maior atividade da enzima ALS, conforme observou SINGH *et alii* (1988b). O material foi coletado de plantas em pleno desenvolvimento para a realização da extração da enzima. As Figuras 24, 25, 26 e 27 contém os resultados dos bioensaios “in vitro” para os herbicidas imazethapyr, chlorimuron-etil, pirimidiloxibenzoato (POB) e flumetsulan. Estes herbicidas são potentes inibidores da enzima ALS, porém pertencem a grupos químicos diferentes. Os herbicidas foram incubados com as enzimas e os reagentes necessários para a catálise da produção de acetolactato.

Os dados foram analisados estatisticamente através de regressão linear. Para tanto as concentrações dos herbicidas foram logaritmizadas e introduzidas nos cálculos desta forma. O eixo das abscissas dos gráficos são escalas lineares do logaritmo neperiano (Ln) das concentrações. No eixo das ordenadas está locada uma escala percentual de atividade da enzima, em relação ao controle, onde a reação deu-se de forma plena. Convém salientar que os dados referem-se às leituras de absorbância realizadas em espectrofotômetro à 530 nm. De todas as leituras, foram extraídos os valores do controle zero. Este procedimento é adotado para a eliminação de possíveis efeitos colorimétricos devidos a outros componentes que não os produtos da reação da enzima ALS.

Figura 24: Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (μM) do herbicida imazethapyr. Porcentagem de atividade em relação ao controle.

Figura 25: Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (nM) do herbicida chlorimuron-etil. Porcentagem de atividade em relação ao controle.

Figura 26: Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (nM) do herbicida pirimidiloxibenzato (POB). Porcentagem de atividade em relação ao controle.

Figura 27: Bioensaio com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L., submetida a diferentes concentrações (nM) do herbicida flumetsulan. Porcentagem de atividade em relação ao controle.

A atenta observação dos gráficos mostra que as retas, representativas da atividade da enzima extraída das populações resistentes, estão sempre em posição superior às retas representativas da atividade da enzima extraída das populações suscetíveis. Igualmente, a linha mediana horizontal cruza-se com as retas no ponto estimado do I_{50} , ou seja, o ponto da concentração necessária para inibir a atividade da enzima em 50%. As concentrações referentes ao I_{50} para as populações suscetíveis são sempre inferiores às concentrações referentes ao I_{50} para as populações resistentes. A tendência repetiu-se para os quatro herbicidas que participaram do bioensaio. Isto mostra que a menor sensibilidade da enzima das populações resistentes manifesta-se em relação aos quatro diferentes grupos químicos, o que caracteriza a resistência cruzada.

A insensibilidade do sítio de ação, conferindo resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS tem sido relatada para várias espécies de plantas daninhas em várias partes do mundo. Os dados obtidos para a planta daninha *Bidens pilosa* L. são parecidos com os descritos nos trabalhos de HALL & DEVINE (1990) e PRIMIANI *et alii* (1990) para as plantas daninhas *Stellaria media* e *Kochia scoparia*. A particularidade é tratar-se da confirmação de uma suspeita para as condições brasileiras.

Sem dúvida, como comprovam os dados bioquímicos, a enzima ALS extraída das populações resistentes de *Bidens pilosa* L., tanto advindos do Rio Grande do Sul quanto de Mato Grosso do Sul, apresentam uma menor sensibilidade aos herbicidas. Estas populações são resistentes aos herbicidas,

já que não há uma diminuição significativa na atividade da enzima mesmo na presença dos herbicidas.

Outrossim, as doses empregadas em condições de campo devem ter selecionado as populações com atividade enzimática diferenciadas, reduzindo a concorrência intrapopulação. Cabe ressaltar que nas áreas de ocorrência destas populações, a competição interespecífica dava-se apenas entre a cultura da soja e o *Bidens pilosa* L., em alta densidade. Os herbicidas empregados exerciam uma elevada pressão de seleção, praticamente eliminando outras plantas daninhas. Esta característica é apontada por MALLORY-SMITH *et alii* (1993) como indicativa da probabilidade de ocorrência de resistência.

A complementação da análise pode ser feita através da observação da Tabela 7. As equações de regressão calculadas para os dados experimentais permitem a estimativa para o I_{50} das enzimas de todas as populações face à ação inibitória dos herbicidas. A relação do I_{50} de cada população resistente com a média das populações suscetíveis mostra que foram necessárias doses pelo menos 3 vezes superiores para serem atingidos os mesmos níveis de inibição da enzima extraída de populações suscetíveis. A população R2 foi a que exibiu maior nível de resistência em relação aos quatro herbicidas do experimento. Já a população S1, encontrado na região de São Gabriel D'Oeste, região de ocorrência das populações resistentes R1 e R2, mostrou-se a mais sensível ao efeito inibitório dos herbicidas. Estas variações de sensibilidade entre populações e entre herbicidas são frequentemente

Tabela 7: Equações de regressão linear e cálculo do I_{50} para os bioensaios "in vitro" realizados com a enzima ALS extraída de cinco populações de *Bidens pilosa* L.

Herbicida	POPULAÇÃO	EQUAÇÃO	I_{50}	R/S médio
Imazethapyr	R1	$I = 103.0892 - 12.17703 L \text{ [Dose]}$	78,24	4,58
	R2	$I = 159.554405 - 18.394362 L \text{ [Dose]}$	386,01	22,59
	R3	$I = 90.689971 - 10.322140 L \text{ [Dose]}$	51,52	3,02
	S1	$I = 88.846285 - 16.247494 L \text{ [Dose]}$	10,92	
	S2	$I = 97.069033 - 14.959374 L \text{ [Dose]}$	23,25	
Chlorimuron - etil	R1	$I = 113.632261 - 11.713310 L \text{ [Dose]}$	228,71	5,23
	R2	$I = 128.394832 - 12.675106 L \text{ [Dose]}$	485,39	11,11
	R3	$I = 97.700204 - 9.308818 L \text{ [Dose]}$	168,07	3,85
	S1	$I = 100.640146 - 15.732246 L \text{ [Dose]}$	25,00	
	S2	$I = 112.190691 - 15.045248 L \text{ [Dose]}$	62,40	
Primidiloxibenzoato	R1	$I = 76.95.1507 - 7.333700 L \text{ [Dose]}$	39,45	16,25
	R2	$I = 89.440732 - 6.509303 L \text{ [Dose]}$	428,00	176,35
	R3	$I = 67.729705 - 6.303203 L \text{ [Dose]}$	16,66	6,86
	S1	$I = 54.052983 - 10.201915 L \text{ [Dose]}$	1,49	
	S2	$I = 67.338382 - 10.974787 L \text{ [Dose]}$	4,85	
Flumetsulan	R1	$I = 115.652479 - 11.438511 L \text{ [Dose]}$	310,94	6,71
	R2	$I = 146.120225 - 13.980402 L \text{ [Dose]}$	968,12	20,88
	R3	$I = 99.030137 - 9.137069 L \text{ [Dose]}$	214,02	4,62
	S1	$I = 101.368789 - 16.831442 L \text{ [Dose]}$	21,16	
	S2	$I = 113.744179 - 14.925024 L \text{ [Dose]}$	71,59	

observadas, como relatado por SIVAKUMARAN *et alii* (1991), HORAK & PETERSON (1995) e KWON E PENNER (1995).

Do conjunto de dados obtidos, pode-se afirmar que a resistência das populações de *Bidens pilosa* L. é devida à alterações no sítio de ação da enzima ALS. É difícil afirmar se outros mecanismos estão envolvidos, como a metabolização das moléculas, conforme observado por KEMP *et alii* (1990) e CHRISTOPHER *et alii* (1991). Ao mesmo tempo, a exata localização da mutação genética que proporcionou a alteração na enzima carece de ser conhecida no futuro. Este tipo de pesquisa já tem sido realizado por GUTTIERI *et alii* (1992) e EBERLEIN & GUTTIERI (1993), para as plantas daninhas *Kochia scoparia*, *Salsola iberica* e *Lactuca serriola*, nos Estados Unidos da América.

Outro aspecto a ser considerado é a habilidade reprodutiva e a prolificidade da planta daninha *Bidens pilosa* L.. O grande número de gerações sucessivas em um ano (ARANHA *et alii*, 1988) e o grande número de disseminulos produzidos (KISSMANN & GROTH, 1992), fazem com que esta planta enquadre-se dentre aquelas com grande probabilidade de aparecimento de resistência (JASIENIUK *et alii*, 1996). Ao mesmo tempo, estas características estão intimamente relacionadas ao sucesso na adaptação ecológica, segundo SILVERTOWN (1987), com reflexos na sobrevivência e disseminação.

4.3. Controle alternativo

O controle alternativo de populações resistentes de picão-preto com diversos herbicidas pode ser analisado nas Tabelas 8 a 12. Os herbicidas imazethapyr, chlorimuron-etil e flumetsulan falharam no controle das populações resistentes, como era previsto, embora tenham controlado satisfatoriamente as populações suscetíveis. As populações resistentes, porém, foram eficazmente controlados pelos herbicidas sulfentrazone, bentazon, lactofen, fomesafen, acifluorfen e misturas de tanque destes herbicidas com os três inibidores da enzima ALS. Estas mistura justificam-se à medida que ampliam o espectro de controle necessário para a cultura em questão. Atingem, também, as populações problemas. Devem ser incluídos em programas de manejo, não só através de misturas, mas também em rotação de herbicidas.

Segundo GRESSEL & SEGEL (1990) o uso de herbicidas alternativos, com diferentes mecanismos de ação, pode representar uma estratégia de sucesso no controle de plantas daninhas resistentes. Além disto, WRUBEL & GRESSEL (1994) acrescentam que a eficácia da mistura depende do herbicida controlar o mesmo espectro de plantas daninhas, ter a mesma persistência, ter degradação de forma diferente e, se possível, ter uma resistência cruzada negativa, características estas tomadas em confronto com os herbicidas que irão participar da mistura. CHRISTOFFOLETI *et alii* (1994) afirmam que a rotação de culturas pode permitir o uso de diferentes herbicidas. Isto pode colaborar para reduzir a pressão de seleção sobre o agroecossistema.

Tabela 8: Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle da população resistente R1 de *Bidens pilosa* L.

Herbicidas	Dose (g i.a. / ha)	Visual		Fitomassa		% de redução de fitomassa	
		7 DAT	14 DAT	% controle	produção média (g / parc.)	PMV	PMS
1. Testemunha		0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,960 a	0,170 ab	0,0 c
2. Imazethapyr	100,00	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,920 a	0,187 a	8,6 bc
3. Chlorimuron-etil	20,00	24,9 b	21,6 b	0,310 b	0,120 b	64,3 b	27,1 b
4. Flumetsulan	120,00	1,1 c	0,6 c	1,070 a	0,207 a	3,4 c	2,1 c
5. Sulfentrazone	50,00	96,7 a	99,4 a	0,113 bc	0,033 c	92,5 a	84,0 a
6. Bentazon	900,00	99,4 a	100,0 a	0,027 c	0,020 c	97,6 a	89,4 a
7. Lactofen	200,00	100,0 a	100,0 a	0,023 c	0,017 c	97,3 a	90,5 a
8. Fomesafen	250,00	98,9 a	99,4 a	0,060 bc	0,020 c	94,7 a	87,1 a
9. Acifluorfen	255,00	97,8 a	96,7 a	0,160 bc	0,040 c	82,1 ab	74,7 a
10. Acifluorfen + Bentazon	160,00 600,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,013 c	98,5 a	91,9 a
11. Imazethapyr + Lactofen	100,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,017 c	0,020 c	97,2 a	88,3 a
12. Imazatepyr + Fomesafen	100,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,027 c	0,013 c	97,8 a	91,4 a
13. Imazethapyr + Acifluorfen	100,00 255,00	100,0 a	100,0 a	0,020 c	0,017 c	97,7 a	90,6 a
14. Chlorimuron-etil + Lactofen	20,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,010 c	0,013 c	98,5 a	90,6 a
15. Chlorimuron-etil + Fomesafen	20,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,013 c	98,2 a	92,4 a
16. Chlorimuron-etil + Acifluorfen	20,00 255,00	100,0 a	100,0 a	0,017 c	0,017 c	100,0 a	90,0 a

Tabela 9: Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle da população resistente R2 de *Bidens pilosa* L.

Herbicidas	Dose (g i.a. / ha)	Visual		Fitomassa		% de redução de fitomassa	
		7 DAT	14 DAT	PMV	PMS	PMV	PMS
1. Testemunha		0,0 c	0,0 d	0,987 a	0,200 a	0,0 d	0,0 c
2. Imazethapyr	100,00	21,4 b	8,2 bc	0,830 a	0,157 a	17,1 c	20,0 b
3. Chlorimuron-etil	20,00	20,9 b	18,4 b	0,460 b	0,170 a	51,6 b	14,2 b
4. Flumetsulan	120,00	6,7 bc	2,4 cd	0,893 a	0,170 a	7,0 cd	11,3 bc
5. Sulfentrazone	50,00	91,8 a	99,4 a	0,097 c	0,040 b	90,1 a	81,4 a
6. Bentazon	900,00	100,0 a	100,0 a	0,053 c	0,043 b	95,1 a	80,6 a
7. Lactofen	200,00	100,0 a	100,0 a	0,037 c	0,027 b	96,7 a	91,7 a
8. Fomesafen	250,00	100,0 a	100,0 a	0,057 c	0,037 b	94,3 a	83,5 a
9. Acifluorfen	255,00	90,7 a	98,9 a	0,157 c	0,047 b	86,4 a	77,9 a
10. Acifluorfen + Bentazon	160,00 600,00	100,0 a	100,0 a	0,043 c	0,033 b	95,8 a	84,8 a
11. Imazethapyr + Lactofen	100,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,043 c	0,020 b	95,7 a	90,3 a
12. Imazatepyr + Fomesafen	100,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,050 c	0,030 b	95,1 a	85,0 a
13. Imazethapyr + Acifluorfen	100,00 255,00	97,6 a	100,0 a	0,063 c	0,030 b	93,8 a	86,8 a
14. Chlorimuron-etil + Lactofen	20,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,057 c	0,037 b	94,4 a	81,8 a
15. Chlorimuron-etil + Fomesafen	20,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,050 c	0,047 b	95,0 a	77,3 a
16. Chlorimuron-etil + Acifluorfen	20,00 255,00	99,4 a	100,0 a	0,027 c	0,020 b	97,3 a	92,0 a

Tabela 10: Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle da população resistente R3 de *Bidens pilosa* L.

Herbicidas	Dose (g i.a. / ha)	Visual		Fitomassa		% de redução de fitomassa	
		7 DAT	14 DAT	produção média (g / parc.)	PMS	PMV	PMS
1. Testemunha		0,0 c	0,0 c	0,750 a	0,133 a	0,0 d	0,0 c
2. Imazethapyr	100,00	0,0 c	0,0 c	0,643 a	0,123 a	14,2 cd	5,4 bc
3. Chlorimuron-etil	20,00	46,7 b	21,4 b	0,360 b	0,097 a	51,0 b	25,7 b
4. Flumetsulan	120,00	3,0 c	1,7 c	0,683 a	0,143 a	8,9 cd	2,5 c
5. Sulfentrazone	50,00	100,0 a	100,0 a	0,027 c	0,013 b	96,4 a	90,8 a
6. Bentazon	900,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,033 b	98,2 a	77,8 a
7. Lactofen	200,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,010 b	98,3 a	95,1 a
8. Fomesafen	250,00	100,0 a	100,0 a	0,020 c	0,013 b	97,4 a	90,5 a
9. Acifluorfen	255,00	99,4 a	100,0 a	0,050 c	0,020 b	94,1 a	84,5 a
10. Acifluorfen + Bentazon	160,00 600,00	100,0 a	100,0 a	0,020 c	0,013 b	97,5 a	92,2 a
11. Imazethapyr + Lactofen	100,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,010 c	0,010 b	98,7 a	93,7 a
12. Imazatepyr + Fomesafen	100,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,010 b	98,2 a	92,4 a
13. Imazethapyr + Acifluorfen	100,00 255,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,010 b	98,2 a	92,2 a
14. Chlorimuron-etil + Lactofen	20,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,020 c	0,017 b	97,4 a	89,2 a
15. Chlorimuron-etil + Fomesafen	20,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,017 c	0,010 b	97,8 a	91,4 a
16. Chlorimuron-etil + Acifluorfen	20,00 255,00	100,0 a	100,0 a	0,013 c	0,013 b	98,2 a	90,2 a

Tabela 11: Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle da população susceptível S1 de *Bidens pilosa* L.

Herbicidas	Dose (g i.a. / ha)	% controle		Fitomassa		% de redução	
		7 DAT	14 DAT	PMV	PMS	PMV	PMS
1. Testemunha		0,0 b	0,0 c	1,127 a	0,193 a	0,0 b	0,0 b
2. Imazethapyr	100,00	79,5 a	93,3 b	0,273 b	0,040 b	80,7 a	83,6 a
3. Chlorimuron-etil	20,00	75,0 a	100,0 a	0,053 b	0,020 b	95,4 a	90,4 a
4. Flumetsulan	120,00	81,1 a	100,0 a	0,033 b	0,030 b	97,1 a	87,2 a
5. Sulfentrazone	50,00	90,0 a	100,0 a	0,023 b	0,023 b	97,9 a	89,2 a
6. Bentazon	900,00	87,3 a	100,0 a	0,023 b	0,017 b	97,9 a	91,0 a
7. Lactofen	200,00	90,0 a	100,0 a	0,027 b	0,023 b	97,7 a	88,1 a
8. Fomesafen	250,00	90,0 a	100,0 a	0,053 b	0,030 b	95,3 a	85,7 a
9. Acifluorfen	255,00	83,9 a	100,0 a	0,083 b	0,030 b	93,1 a	87,6 a
10. Acifluorfen + Bentazon	160,00 600,00	90,0 a	100,0 a	0,027 b	0,017 b	97,9 a	91,8 a
11. Imazethapyr + Lactofen	100,00 200,00	90,0 a	100,0 a	0,053 b	0,027 b	95,3 a	89,4 a
12. Imazatepyr + Fomesafen	100,00 250,00	90,0 a	99,4 ab	0,100 b	0,027 b	91,2 a	87,0 a
13. Imazethapyr + Acifluorfen	100,00 255,00	90,0 a	100,0 a	0,087 b	0,023 b	92,3 a	89,7 a
14. Chlorimuron-etil + Lactofen	20,00 200,00	90,0 a	100,0 a	0,023 b	0,017 b	97,9 a	92,0 a
15. Chlorimuron-etil + Fomesafen	20,00 250,00	90,0 a	100,0 a	0,017 b	0,013 b	98,5 a	94,2 a
16. Chlorimuron-etil + Acifluorfen	20,00 255,00	90,0 a	100,0 a	0,020 b	0,020 b	98,3 a	91,4 a

Tabela 12: Efeito de diversos tratamentos com herbicidas no controle da população susceptível S2 de *Bidens pilosa* L.

Herbicidas	Dose (g i.a. / ha)	Visual		Fitomassa		% de redução de fitomassa	
		7 DAT	14 DAT	produção média (g / parc.)	PMS	PMV	PMS
1. Testemunha		0,0 b	0,0 b	0,920 a	0,193 a	0,0 b	0,0 b
2. Imazethapyr	100,00	90,8 a	99,4 a	0,107 b	0,053 b	89,8 a	72,3 a
3. Chlorimuron-etil	20,00	90,8 a	100,0 a	0,050 b	0,023 b	95,1 a	87,3 a
4. Flumetsulan	120,00	100,0 a	100,0 a	0,033 b	0,020 b	96,3 a	88,6 a
5. Sulfentrazone	50,00	98,9 a	99,9 a	0,053 b	0,023 b	94,4 a	88,5 a
6. Bentazon	900,00	100,0 a	100,0 a	0,013 b	0,017 b	98,6 a	92,7 a
7. Lactofen	200,00	99,4 a	100,0 a	0,033 b	0,027 b	96,4 a	87,2 a
8. Fomesafen	250,00	100,0 a	99,7 a	0,043 b	0,023 b	95,7 a	90,4 a
9. Acifluorfen	255,00	97,3 a	96,7 a	0,127 b	0,033 b	86,6 a	83,6 a
10. Acifluorfen + Bentazon	160,00 600,00	100,0 a	100,0 a	0,033 b	0,020 b	96,3 a	90,0 a
11. Imazethapyr + Lactofen	100,00 200,00	99,4 a	100,0 a	0,103 b	0,027 b	89,2 a	87,3 a
12. Imazatepyr + Fomesafen	100,00 250,00	100,0 a	99,7 a	0,057 b	0,030 b	93,7 a	84,2 a
13. Imazethapyr + Acifluorfen	100,00 255,00	100,0 a	100,0 a	0,040 b	0,030 b	95,7 a	84,1 a
14. Chlorimuron-etil + Lactofen	20,00 200,00	100,0 a	100,0 a	0,070 b	0,017 b	92,4 a	92,8 a
15. Chlorimuron-etil + Fomesafen	20,00 250,00	100,0 a	100,0 a	0,050 b	0,027 b	94,6 a	85,7 a
16. Chlorimuron-etil + Acifluorfen	20,00 255,00	100,0 a	100,0 a	0,017 b	0,013 b	98,2 a	93,1 a

RODRIGUES & ALMEIDA (1995) confirmam o bom controle exercida pelos herbicidas selecionados sobre a planta daninha picão-preto (*Bidens pilosa* L.).

A organização dos setores de ensino, pesquisa e extensão, atuando conjuntamente com a indústria e os produtores pode atenuar os problemas de resistência. No entanto, segundo SHANER (1995), é necessário o sagaz monitoramento do problema para enfrentar o desafio de desenvolver métodos econômicos, eficientes e capazes de preservar o ambiente, para o controle de plantas daninhas.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos em casa-de-vegetação e laboratório, as seguintes conclusões podem ser extraídas :

- 5.1. As sementes de *Bidens pilosa* L. coletadas nas regiões de São Gabriel D'Oeste e Passo Fundo, Estados do Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, respectivamente, são provenientes de populações resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS.
- 5.2. Foi comprovada a hipótese do motivo da resistência ser promovida por uma alteração na atividade da enzima dos referidos herbicidas. Bioensaios realizados "in vitro" com a enzima ALS das populações resistentes e suscetíveis, indicaram a grande diferença de sensibilidade da enzima na presença dos herbicidas inibidores. A enzima extraída de populações resistentes mantém a sua atividade mesmo na presença de altas concentrações de herbicidas.
- 5.3. A resistência manifesta-se em relação aos grupos químicos inibidores sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopirimidinas sulfonamidas e pirimidiloxibenzoatos utilizados nos experimentos, o que caracteriza o fenômeno da presença de resistência cruzada.

5.4. As populações resistentes não foram controlados por aplicações de herbicidas inibidores da enzima ALS, às dose normalmente empregadas para o controle desta planta daninha a nível de campo. Porém, herbicidas alternativos como o sulfentrazone, bentazon, lactofen, fomesafen e acifluorfen, controlam eficientemente biotipos resistentes da planta daninha *Bidens pilosa* L.. Tais herbicidas podem ser usados em programas de manejo ou rotação, em áreas onde haja resistência comprovada desta planta daninha.

5. BIBLIOGRAFIA

- ABELL, L.M. Biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design. **Weed Science**, v.44, n.3, p.734-742, 1996.
- AHRENS, W.H.; STOLLER, E.W. Competition, growth rate and CO₂ fixation in triazine -susceptible and -resistant smoothpigweed (*Amaranthus hybridus*). **Weed Science**, v.31, p.438-444, 1983.
- ALCOCER-RUTHLING, M.; THILL, D.C.; SHAF II, B. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, v.6, p.303-09, 1992a.
- ALCOCER-RUTHLING, M.; THILL, D.C.; SHAF II, B. Seed biology of sulfonylurea-resistant and susceptible biotypes of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, v.6, p.858-64, 1992b.
- ALTERMAN, M.K. Malezas: ecofisiologia y estrategias de control. Santiago: Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica, 1992. 402p.
- ANDERSEN, R.N. **Germination and establishment of weeds for experimental purposes**. New York: W. F. Humphrey Press, 1968. 236p.

- ARANHA, C.; LEITÃO FILHO, H.de F.; YAHN, C.A. **Sistemática de plantas invasoras**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1988. 174p.
- AREVALO, R.A.; BLANCO, H.G.; IGUE, T. Influência da convivência de picão-preto (*Bidens pilosa*) com plantas de soja. II-Efeito de diferentes densidades populacionais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 18., Brasília, 1991. **Resumos**. Campinas: Instituto Biológico, 1991. p.23.
- BANDEEN, J.D.; STEPHENSON, G.R.; COWETI, E.R. Discovery and distribution of herbicide-resistant weeds in North America. In: LeBARON, H.M.; GRESSEL, J. **Herbicide resistance in plants**. New York: John Willey, 1982. p.9-30.
- BAUER, T.A.; RENNER, K.A.; PENNER, D.; KELLY, J.D. Pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) varietal tolerance to imazethapyr. **Weed Science**, v.43, n.3, p.417-424, 1995.
- BERNASCONI, P.; WOODWORTH, A.R.; ROSEN, B.A.; SUBRAMANIAN, M.V.; SIEHL, D.L. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. **Journal of Biology and Chemistry**, v.270, p.17381-17385, 1995.
- BEYER JR., E.M.; DUFFY, M.J.; HAY, J.V.; SCHLUETER, D.D. **Sulfonylureas**. Washington, American Chemical Society, 1984. 499p.
- BRAIN, P.; COUSENS, R. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. **Weed Research**, v.29, p.93-96, 1989.

- BROWM, H.M.; COTTERMAN, J.C. Recent advances in sulfonylurea herbicides. **Chemistry of Plant Protection**, v.10, p.47-81, 1994.
- BRYAN, J.K. Advances in the biochemistry of aminoacid biosynthesis. In: CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1990. v.16, p.161-165.
- BURNSIDE, O.C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, v.6, n.3, p.621-625, 1992.
- CAREY III, V.F.; HOAGLAND, R.E.; TALBERT, R.E. Verification and distribution of propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas. **Weed Technology**, v.9, n.2, p.366-372, 1995.
- CHALEFF, R.S.; MAUVAIS, J. Acetolactate synthase is site of action of two sulfonylureas herbicides in higher plants. **Science**, v.224, p.1443-1444, 1984.
- CHALEFF, R.S.; RAY, T.B. Herbicide-resistant mutants from tabaco cell cultures. **Science**, v.223, p.1148-1151, 1984.
- CHAUVAL, B.; GASQUEZ, J. Study of the growth of herbicide-resistant black-grass populations. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKINS, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 431-432.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Growth, competitive ability, and fitness of sulfonylurea resistant and susceptible *Kochia scoparia*. Fort Collins, 1993. 198p. Dissertation (Ph.D) Colorado State University.

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

CHRISTOFFOLETI, P.J.; WESTRA, P. Competition and coexistence of sulfonylurea resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*) biotypes in unstable environments. In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, 32, 1992a. **Proceedings**, p.17.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; WESTRA, P. Measuring the effects of density and proportion on the competitive ability of ALS resistant and susceptible kochia biotypes. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE, 45, 1992b. **Proceedings**, p.83.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; PONCHIO, J.A. de R.; BERG, C.V.D.; VICTORIA FILHO, R. Imidazolinone resistant *Bidens pilosa* in the Brazilian Soybean Areas. In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, 36, Norfolk, 1996. **Proceedings**, p.10.

CHRISTOPHER, J.T.; POWLES, S.B.; LILJEGREN, D.R.; HOLTUM, J.A.M. Cross-resistance herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). II. Chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. **Plant Physiology**, v.95, p.1036-1043, 1991.

CLAY, D.V. New development in triazine and paraquat resistance and co-resistance in weed species in England. In: THE 1989 BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE-WEEDS, 1989. **Proceedings**, 1989. p.317-324.

COMPLAND, D. The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K.

Herbicide resistance in weeds and crops. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.263-78.

CONARD, S.G.; RADOSEVICH, S.R. Ecological fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* biotypes resistant or susceptible to atrazine. **Journal of Applied Ecology**, v.16, p.171-177, 1979.

COOPER, J.G. **The tools of biochemistry.** New York: A Wiley-Intescience, 1977. 423p.

CURRIE, R.S.; REGEHR, D.L. Methods of measuring the impact of the XA17 geneon imazethapyr injury in corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v.9, n.4, p.676-681, 1995.

CURRIE, R.S.; KWON, C.S.; PENNER, D. Magnitude of imazethapyr resistance of corn (*Zea mays*) hybridis with altered acetolactate synthase. **Weed Science**, v.43, n.4, p.578-582, 1995.

DARMENCY, H.; GASQUEZ, J. Appearance and spread of triazine resistance in common lambsquarters (*Chenopodium album*). **Weed Technology**, v.4, n.1, p.173-177, 1990.

DE MARINIS, G. Anomalias cotiledonares em *Bidens pilosa* L. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E ERVAS DANINHAS, 12., Fortaleza, 1978. **Resumos** 1978. p.120.

DE MARINIS, G. Organização do capítulo frutífero e heterocarpia em picão preto (*Bidens pilosa* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E ERVAS DANINHAS, 14.; e CONGRESSO DE LA ASSOCIACION LATINO

AMERICANA DE MALEZAS, 6., Campinas, SP, 1982. **Resumos**. 1982. p.11-12.

DIAS, C.T.dos S. **Estatística básica através do SAS para Windows**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , Departamento de Matemática e Estatística, 1995. 138p.

DODGE, A.D. Mechanisms of paraquat tolerance. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.165-175.

DUKKY, M.J.; HAY, J.V.; SCHLUETER, D.D. Sulfonylureas. In: KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. **Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action**. New York: Marcel Dekker Inc., 1988. 403 p.

DURNER, J.; GAILUS, V.; BOGER, P. New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. **Plant Physiology**, v.95, p.1144-1149, 1990.

DYER, W.E.; CHEE, P.W.; FAY, P.K. Rapid germination of sulfonylurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions is associated with elevated seed levels of branched chain aminoacids. **Weed Science**, v.41, p.18-22, 1993.

EBERLEIN, C.V.; GUTTIERI, M.J. DNA sequence variation in the acetolactato synthase gene of ALS inhibition resistant *Kochia scoparia*. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 46, 1993. **Proceedings**, 1993. p.127.

FELIPPE, G.M. Estudos de germinação, crescimento e floração de *Bidens pilosa*. **Revista do Museu Paulista** , v.24, p.183-217, 1978a.

- FELIPPE, G.M. Germinação de *Bidens gardneri* Baker, uma planta anual dos cerrados. **Hoehnea**, v.17, n.2, p.7-11, 1978b.
- FUERST, E.P.; VAUGHN, K.C. Mechanism of paraquat resistance. **Weed Technology**, v.4, n.1, p.150-56, 1990.
- FUERST, E.P.; HORMAN, M.A. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. **Weed Science**, v.39, p.458-464, 1991.
- GERWICK, B.C.; MIRELES, L.C.; EILERS, R.J. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistance weeds. **Weed Technology**, v.7, n.2, p.519-524, 1993.
- GERWICK, B.C.; SUBRAMARIAN, M.A.; GALLANT, U.I.; CHANDLER, D.P. Mechanism of action of the 1,2,4-triazolo-1,5-a-pyrimidines. **Pesticide Science**, v.29, p.357-364, 1990.
- GILL, G.S.; COUSENS, R.D.; ALLAN, M.R. Germination, growth, and development of herbicide resistant and susceptible populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, v.44, n.2, p.252-256, 1996.
- GOLDBURG, R.J. Environmental concerns with the development of herbicide-tolerant plants. **Weed Technology**, v.6, n.3, p.647-52, 1992.
- GOULD, F. Comparisons between resistance management strategies for insects and weeds. **Weed Technology**, v.9, n.4, p.830-839, 1995.
- GRAY, J.A.; STOLTENBERG, D.E.; BALKE, N.E. Productivity and intraspecific competitive ability of a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype resistant to atrazine. **Weed Science**, v.43, n.4, p.619-26, 1995.

- GRESSEL, J. Need herbicide resistance have evolved? Generalizations from around the world. In: AUSTRALIAN WEEDS CONFERENCE, 9., 1990. **Proceedings**, 1990. p.173-184.
- GRESSEL, J. Why get resistance ? It can be prevented or delayed. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann , 1991. p.1-25.
- GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. The paucity of genetic adaptative resistance of plants to herbicides : possible biological reasons and implications. **Journal of Theoretical Biology**, v.75, p.349-371, 1978.
- GRESSEL, J. & SEGEL, L.A. Herbicide rotations and mixtures: effective strategies to delay resistance. In: GREEN, M.B.; LeBARON, H.L.; MOBERG, W.K. **Managing Resistance to Agrochemical: from Fundamental Research to Practical Strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 430-458.
- GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. Modelling the effectiveness of herbicide rotation and mixtures strategies to delay or perclude resistance. **Weed Technology**, v.4, p.186-198, 1989.
- GUTTIERI, M.J.; EBERLEIN, C.V.; MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; HOFFMAN, D.L. DNA sequence variation in domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide -resistant and susceptible weed biotypes. **Weed Science**, v.40, p.670-676, 1992.
- HALL, L.M.; DEVINE, M.D. Cross-resistance of a chlorsulfuron resistant biotype of *Stellaria media* to a triazolopyrimidine herbicide. **Plant Physiology**, v.93, p.962, 1990.

- HARRISON JR., H.F. Developing herbicide-tolerant crop cultivars: introduction. **Weed Technology**, v.6, n.3, p.613-614, 1992.
- HAWKES, T.R. Studies of herbicides which inhibit branched amino acid biosynthesis. In: COPPING, L.G.; DALZIEL, J.; DODGE, A.D. **Prospects for amino acids biosynthesis inhibitors in crop protection and pharmaceutical chemistry**. Survey: Society of Chemical Industry Survey, 1989. p. 131-38. (BCPC Monography,42)
- HEAP, I.; KNIGHT, R. The occurrence of herbicide cross-resistance in a annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. **Australian Journal of Agriculture**, v.37, p.149-156, 1986.
- HEAP, I.M.; MORRISON, I.N. Resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Science**, v.44, n.1, p.25-30, 1996.
- HOLT, J. Fitness and ecological adaptability of herbicide resistant biotypes. In: GREEN, M.B.; LeBARON, H.L.; MOBERG, W.K. **Managing Resistance to Agrochemical: from Fundamental Research to Practical Strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990a. p.419-429.
- HOLT, J. ; LeBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed Technology**, v.4, p.141-149, 1990b.
- HOLT, J.; STEMLER, A.J.; RADOSEVICH, S.R. Differential lights responses of photosynthesis by triazine-resistant and triazine-susceptible *Senecio brasiliensis* biotypes. **Plant Physiology**, v.67, p.744-748, 1981.

- HOLT, J.S.; POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. **Annual Review of Physiology Plant Molecular Biology**, v.44, p.203-209, 1993.
- HOLTUM, J.A.M.; MATTHEWS, J.M.; HAUSLER, J.M.; LILJEGREN, R.E.; POWLES, S.B. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). III. On the mechanisms of resistance to diclofop-methyl. **Plant Physiology**, v.97, p.1026-1034, 1991.
- HORAK, M.J.; PETERSON, D.E. Biotypes of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and common waterhemp (*Amaranthus rudis*) are resistant to imazethapyr and thifensulfuron. **Weed Technology**, v.9, n.1, p.192-95, 1995.
- JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v.44, n.1, p.176-193, 1996.
- JURSINIC, P.A.; PEARCY, W. Determination of the rate limiting step for photosynthesis in a nearly isonuclear rapeseed (*Brassica napus* L.) biotype resistant to atrazine. **Plant Physiology**, v.88, p.1195-1200, 1988.
- KEMP, M.S.; MOSSET, S.R.; THOMAS, T.T. Herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides*. In: GREEN, M.B.; LeBARON, H.M.; MOBERG, W.K. **Managing Resistance to Agrochemical: from Fundamental Research to Practical Strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.376-393.
- KIRSZENZAF, S.L. Desenvolvimento vegetativo de *Bidens pilosa* L.: Fotoperíodo, temperatura e substâncias reguladoras de crescimento. São Paulo, 1975. 134p. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

- KIRSZENZAF, S.L.; VÁLIO, I.F.M. Efeito do fotoperíodo na formação de ramos laterais em *Bidens pilosa* L. **Ciência e Cultura**, v.29, n.4, p.459-462, 1977.
- KIRSZENZAF, S.L.; VÁLIO, I.F.M. The effect of growth regulators on height and leaf form in *Bidens pilosa* L. **Hoehnea**, v.6, p.1-6, 1976.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. TOMO II. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 1992. v.2, 798p.
- KNAKE, E.L. Technology transfer for herbicide-tolerant weeds and herbicide-tolerant crops. **Weed Technology**, v.6, n.3, p.662-664, 1992.
- KWON, C.S.; PENNER, D. Response of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Kochia scoparia* to ALS inhibiting herbicides and piperonyl butoxide. **Weed Science**, v.43, n.4, p.561-565, 1995.
- LaROSA, R.A.; SCHLOSS, J.V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron-methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Biology and Chemistry**, v.259, p.8753-8757, 1984.
- LeBARON, H.M. Distribution and seriousness of herbicide resistant weed infestations worldwide. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.27-43.
- LeBARON, H.M. Herbicide resistance in crops and weeds and its management. In: TROPICAL WEED SCIENCE CONFERENCE, 3rd, Kuala Lumpur, 1992. **Proceedings**. 1992. p.23-24.

- LeBARON, H.M. & McFARLAND, J. Herbicide resistance in weeds and crops : an overveiw and prognosis. In: GREEN, M.B.; LeBARON, H.M.; MOBERG, W.K.. **Managing Resistance to Agrochemical: from Fundamental Research to Practical Strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.336-352.
- LEE, K.Y.; TOWNSEND, J.; TEPPERMAN, J.; BLACK, M.; CHUI, C.K. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. **EMBO Journal**, p.1241-48, 1988.
- LEITÃO FILHO, H.de F.; ARANHA, C.; BACCHI, O. **Plantas invasoras no estado de São Paulo**. São Paulo: Hucitel, 1975. v.2, 597p.
- LORENZI, H.J. **Plantas daninhas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa : Plantarum LTDA., 1991. 440p.
- LORENZI, H.J.; GEFFERY, L.S. **Weeds of the U.S. and their control**. New York: AVI, 1987. 355p.
- LUTMAN, P.J.W. Variations in the resistance of *Stellaria media* to mecoprop due to biotype, application method and 1-aminobenzotriazole. **Weed Research**, v.30, p.129-137, 1990.
- MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; DIAL, M.J. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactucca serriola*). **Weed Technology**, v.4, p.163, 1990.
- MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C.; MORISHITA, D. **Herbicide-resistant weeds and their management**. Corvallis: Oregon State University, 1993. (PNW Extension Publication, 437)

- MATSUMOTO, L.S.; DAMIÃO FILHO, C.F.; ALVES, P.L.C.A. Respostas diferentes de explantes de *Bidens pilosa* cultivados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 18., Brasília, DF, 1991. **Resumos**, 1991. p.12.
- MATTHEWS, J.M.; HOLTUM, J.A.M.; LILJEGREN, D.R.; FURNESS, B.; POWLES, S.B. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). **Plant Physiology**, v.94, p.1180-1086, 1990.
- MAXWELL, B.D. Weed thresholds: the space component and considerations for herbicide resistance. **Weed Technology**, v.6, p.205-212, 1992.
- MAXWELL, B.D.; ROUSH, M.L.; RADOSEVICH, S.R. Predicting the evolution and dynamics of herbicides resistance in weed populations. **Weed Technology**, v.4, p.2-13, 1990.
- MAXWELL, B.D.; THILL, D.C.; FAY, P.K.; DYER, W.; WESTRA, P. Simulation of chlorsulfuron resistance evolution in kochia populations. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 46, 1993. **Proceedings**, 1993. p.128-129.
- MORRISON, I.N.; BECKIE, H.; NAWOLSHY, K. The occurrence of trifluralin resistant *Setaria viridis* (green foxtail) in Western Canada. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.67-75.
- MULUGETA, D.; FAY, P.K.; DYER, W.E. The role of pollen in the spread of sulfonylurea resistant *Kochia scoparia* L. (Schrad.). In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, 32 , 1992. **Proceedings**. 1992, p.16.

- MULUGETA, D.; FAY, P.K.; DYER, W.E.; TALBERT, L.E. Inheritance of resistance to the sulfonylurea herbicides in *Kochia scoparia* L. (Schrad.). In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 44 , 1991. **Proceedings**. 1991. p.81-82.
- 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**, v.10, n.1, p.85-89, 1996.
- NEWHOUSE, K.; WANG, T.; ANDERSON, P. Imidazolinone-tolerant crops. In: SHANER, D.L.; O'CONNOR, S.L. **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton. CRC Press, 1991. cap.10, p.139-150.
- NEWHOUSE, K.; SHANER, D.; WANG, T.; FINCHER, R. Genetic modification of crop responses to imidazolinone herbicides. In: GREEN, M.B.; LeBARON, H.M.; MOBERG, W.K. **Managing Resistance to Agrochemical: from Fundamental Research to Practical Strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.474-486.
- NEWHOUSE, k.; SINGH, B.K.; SHANER, D.L. STIDHAM, M.A. Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.65-70, 1991.
- NOGUEIRA, M.C.S. **Curso de estatística experimental aplicada a experimentação agrônômica**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Matemática e Estatística, 1995. 168p.
- NOVOSEL, K.M.; RENNER, K.A. Nicosulfuron and primisulfuron root uptake, translocation, and inhibition of acetolactate synthase in sugarbeet (*Beta vulgaris*). **Weed Science**, v.43, n.3, p.342-346, 1995.

- OBARA, S.Y.; ALVES, P.L.C.A.; PAVANI, M.C.M.D. Desenvolvimento do picão preto (*Bidens pilosa*) cultivado em solução nutritiva com diferentes níveis de pH. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 18., Brasília, DF, 1991. **Resumos**. 1991. P.12-13.
- OTT, K.H.; KWAGH, J.G.; STOCCKTON, G.W.; SIDOROV, V.; KAKEFUDA, G. Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Molecular Biology**, v.263, n.2, p.359-68, 1996.
- PEEVER, T.L.; MILGROOM, M.G. Fungicide resistance-lessons for herbicide resistance management. **Weed Technology**, v.9, n.4, p.840-49, 1995.
- PICCOLO, A.L.G.; DE MARINIS, G. Perda de água em plântulas de *Bidens pilosa* cultivadas ao ar livre. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E ERVAS DANINHAS, 13., Ilhéus/Itabuna, BA, 1980. **Resumos**. 1980. p.97-98.
- PONCHIO, J.A. de R.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MELO, M.; VICTORIA FILHO, R. ALS enzyme assay from *Bidens pilosa* biotypes of the Brazilian areas to determine the sensitivity to imidazolinone and sulfonylurea herbicides. In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, 36, Norfolk, 1996. **Proceedings**, p.79.
- POWLES, S.B. ; HOWAT, P.D. Herbicide-resistance weeds in Australia. **Weed Technology**, v.4, p.178-185, 1990.
- PRIMIANI, M.M.; COTTERMAN, J.C.; SAARI, L.L. Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. **Weed Technology**, v.4, p.169-172, 1990.

- RADOSEVICH, S.R.; GHERSA, C.M.; COMSTOCK, G. Concerns a weed scientist might have about herbicide-tolerant crops. **Weed Technology**, v.6, n.3, p.635-39, 1992.
- RAJASEKARAN, K.; GRULA, J.W.; ANDERSON, D.M. Selection and characterization of mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell lines resistant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. **Plant Science**, v.119, n.1-2, p.115-124, 1996.
- RATHINASABAPATHI, B.; KING, J. Herbicide resistance in *Datura innoxia*. **Plant Physiology**, v.96, p.255-261, 1991.
- RAY, T.B. Site of action of chlorsulfuron inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. **Plant Physiology**, v.75, p.827-831, 1984.
- RODELLA, R.C.S.M.; BICUDO, L.R.H.; RODELLA, R.A. Variações no crescimento e na distribuição de recursos em *Bidens pilosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 17., Piracicaba, SP, 1988. **Resumos**. 1988. p.27.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S.de. **Guia de herbicidas**. 3.ed. Londrina: Edição dos Autores, 1995. 675p.
- ROUSH, M.L.; RADOSEVICH, S.R.; MAXWELL, B.D. Future outlook for herbicide-resistance research. **Weed Technology**, v.4, n.1, p.208-214, 1990.
- 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 Ed., 1991. p.387-414.

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

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; PRIMIANI, M.M. Mechanism of sulfonylurea resistance in the broadleaf weed *Kochia scoparia*. **Plant Physiology**, v.93, p.55-65, 1990.

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; SMITH, W.F.; PRIMIANI, M.M. Sulfonylurea resistance in common chickweed, perennial ryegrass, and russian thistle. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.42, p.110-116, 1992.

SAXENA, P.K.; KING, J. Lack of cross-resistance of imidazolinone-resistant cell lines of *Datura innoxia* P. Mill. to chlorsulfuron. **Plant Physiology**, v.94, p.1111-1115, 1990.

SAWICKI, R.M. Definition detection and documentation of insecticide resistance. In: FORD, M.G.; HOLLOMAN, D.W.; KHAMBAY, B.P.S.; SAWICKI, R.M. **Combating resistance to xenobiotics: biological and chemical approaches**. Chichester: Ellis Horwood, 1987. p.105-117.

SCHLOSS, J.V.; AULABAUGH, A. Acetolactato synthase and Ketol-acid reductoisomerase: a search for reason and a reason for a search. In: BARAK et al. **Biosynthesis of branched chain amino acids**. Weinheim: VCH Publishers, 1990.

SCHLOSS, J.V.; CISKANIK, L.M.; VAN DYK, D.E. Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. **Letters to Nature**, v.331, p.360-362, 1988.

- SCHONFELD, M.; YAACOBY, T.; MICHAEL, O.; RUBIM, B. Triazine resistance without reduced vigor in *Phalaris paradoxa*. **Plant Physiology**, v.83, p.329-333, 1987.
- SEBER, G.A.F.; WILD, C.J. **Nonlinear regression**. New York: John Wiley, 1989. 768p.
- SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v.9,n.2, p.218-227, 1995.
- SEKI, A.; ORTEGA, F.; MARTU, J.L. Enzyme sensor for the detection of herbicides inhibiting acetolactate synthase. **Anal.Lett.**, v.29, n.8, p.1259-1271, 1996.
- SHANER, D.L. Mechanisms of resistance to acetolactate synthase/acetohydroxyacid synthase inhibitors. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.187-198.
- SHANER, D.L. Herbicide Resistance: Where are we? How did get here? Where are we going? **Weed Technology**, v.9, n.4, p.852-856, 1995.
- SHANER, D.L.; ANDERSON, P.C.; STIDHAM, M.A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, v.76, p.545-546, 1984.
- SHIMIZU, T.; NAKAYAMA, I.; NAKAO, T.; NEZU, Y.; ABE, H. Inhibition of plant acetolactate synthase by herbicides, pyrimidinyl-salicylic acids. **Journal of Pesticide Science**, v.19, p.59-67, 1994.

- SIEHL, D.L.; BENGTSON, J.P.; BROCKMAN, J.H. et al. Patterns of cross-tolerance to herbicides inhibiting acetohydroxyacid synthase in commercial corn hybrids designed for tolerance to imidazolinones. **Crop Science**, v.36, p.274-278, 1996.
- SILVERTOWN, J.W. **Introduction to plant population ecology**. 2.ed. New York: Longman, 1987. 220 p.
- SIMPSON, D.M.; STOLLER, E.W.; WAX, L.M. An in vivo acetolactate synthase assay. **Weed Technology**, v.9, n.1, p.17-22, 1995.
- SINGH, B.K.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Assay of acetohydroxyacid synthase. **Analytical Biochemistry**, v.171, p.173-179, 1988a.
- SINGH, B.K.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Separation and characterization of two forms of acetohydroxy acid synthase from black mexican sweet corn cells. **Journal of Chromatography**, v.444, p.251-261, 1988b.
- SIVAKUMARAN, K.; MULUGETA, D.; GERHARDT, S.A.; FAY, P.K.; DYER, W.E. Characteristics of diverse sulfonylurea-resistant and susceptible *Kochia scoparia* L. accessions. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 44 , 1991. **Proceedings**. 1991. p. 82.
- SMITH, W.F.; COTTERMAN, J.C.; SAARI, L.L. Effect of ALS-inhibitor herbicides on sulfonylurea-resistant weeds. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 43, 1990. **Proceedings**. 1990. p.24.
- STALLINGS, G.P.; THILL, D.C.; SMITH, C.A. Pollen-mediated gene flow of sulfonylurea-resistant kochia (*Kochia scoparia* (L.) Schrad.). In: WEED

SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING , 46, 1993.
Proceedings, 1993. p.60.

STANNARD, M.E. & FAY, P.K. Selection of alfalfa seedlings for tolerance to chlorsulfuron. In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, 61, 1987. **Proceedings**, 1987. p.45.

STIDHAM, M.A. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. **Weed Science**, v.39, p.428-434, 1990.

STIDHAM, M.A.; SINGH, B.K. Imidazolinone-Acetohydroxyacid synthase interactions. In: SHANER, D.L.; O'CONNOR, S.L. **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap.6, p.71-90.

STOLTENBERG, D.E.; WIEDERHOLT, R.J. Giant foxtail (*Setaria faberi*) resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides. **Weed Science**, v.43, n.4, p.527-535, 1995.

STREIBIG, J.C.; RUDENCO, M.; JENSEN, J.E. Dose-response curves and statistical models. In: STREIBIG, J.C. **Herbicide Bioassays**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.30-55.

SUBRAMANIAN, M.V.; GERWICK, B.C. Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines. In: WHITAKER, J.R.; SONNET, P.E. **Biocatalysis in agricultural biotechnology**, ACS symposium series 389. Washington: American Chemical Society, 1989. p.277-288. (ACS Symposium Series, 389)

SUBRAMANIAM, M.V.; HUNG, H.Y.; DIAS, J.M.; MINES, U.W.; BUTLER, J.H.; JACHETA, J.J. Properties of mutant acetolactate synthase resistant to triazolopyrimidines sulfonalides. **Plant Physiology**, v.94, p.239-244, 1990.

- SWEETSER, P.B.; SCHOW, G.S.; HUTCHISON, J.M. Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.17, p.18-23, 1982.
- TAMASHIRO, J.Y.; LEITÃO FILHO, H.de F. Observações sobre o ciclo de vida de *Bidens pilosa* L. (Compositae-Heliantheae). **Hoehnea**, v.7, p.27-40, 1978.
- THILL, D.C.; MALLORY-SMITH, C.A.; THOMPSON, C.R.; STALLINGS, G.P. The biology of sulfonylurea herbicide resistant kochia biotypes. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 46, 1993. **Proceedings**, 1993. p.127-128.
- THILL, D.C.; MALLORY-SMITH, C.A.; SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; PRIMIANI, M.M.; SALADINI, J.L. Sulfonylurea resistant weeds : discovery, distribution, biology, mechanism and manegement. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Buttlerworth-Heinemann, 1991. p. 115-128.
- THOMPSON, C.R. & THILL, D.C. Sulfonylurea herbicide-resistant and -susceptible kochia (*Kochia scoparia*) growth rate and seed production. In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, 32, 1992. **Proceedings**, 1992. p. 44.
- TONKS, D.J.; WESTRA, P. Control of ALS resistant and susceptible kochia biotypes with pre-emergence treatments of dicamba and metsulfuron. In: WESTERN SOCIETY OF WEED SCIENCE ANNUAL MEETING, 46, 1993. **Proceedings**, 1993. p.74.
- TSAFTARIS, A. The development of herbicide-tolerant transgenic crops. **Field Crop Research**, v.45, n.1-3, p.115-123, 1996.

- Van OORSCHOT, J.L.P. Chloroplastic resistance of weeds to triazines in Europe. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.87-101.
- VAUGHN, K.C. & VAUGHN, M.A. Structural and biochemical characterization of dinitroanilines-resistant *Eleusine*. In: GREEN, M.B., LeBARON, H.M.; MOBERG, W.K. **Managing resistance to agrochemical: from fundamental research to practical strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.364-375.
- VAUGHN, K.C.; VAUGHN, M.A.; GOSSET, B.J. A biotype of goosegrass *Eleusine indica*) with an intermediate level of dinitroaniline herbicide resistance. **Weed Technology**, v.4, n.1, p.157-162, 1990.
- WARWICK, S.I. Herbicide resistance in weedy plants: physiology and population biology. **Annual Review in Ecology and Systematic**, v.22, p.95-144, 1991.
- WESTERFELD, W.W. A colorimetric determination of blood acetoin. **Journal of Biology and Chemistry**, v.161, p.495-502, 1945.
- WIEDERHOLT, R.J.; STOLTENBERG, D.E. Cross-resistance of a large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) accession to aryloxyphenylpropionate and cyclohexanedione herbicides. **Weed Technology**, v.9, n.3, p.518-524, 1995.
- WIEDERHOLT, R.J.; STOLTENBERG, D.E. Similar fitness between large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) accessions resistant or susceptible to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors. **Weed Technology**, v.10, n.1, p.42-49, 1996a.

WIEDERHOLT, R.J.; STOLTENBERG, D.E. Absence of differential fitness between giant foxtail (*Setaria faberii*) accessions resistant and susceptible to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors. **Weed Science**, v.44, n.1, p.18-24, 1996b.

WRUBEL, R.P. & GRESSEL, J. Are herbicides mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance ? A case study. **Weed Technology**, v.8, n.3, p.635-648, 1994.

WYSE, D.L.* Future Impact of crops with modified herbicide resistance. **Weed Technology**, v.6, n.3, p.665-668, 1992.