

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TAXA DE FECUNDAÇÃO CRUZADA E SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM
CAPIM-ARROZ E EFEITO DE TEMPERATURA EM CAPIM-ARROZ E BUVA
RESISTENTES AOS HERBICIDAS

Alexandre Pisoni
Engenheiro Agrônomo/SEIFAI

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Julho de 2015

ALEXANDRE PISONI
Bacharel em Agronomia - SEI-FAI/Faculdade de Itapiranga

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 04.08.2015
Pela Banca Examinadora

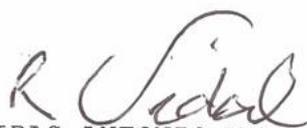


ALDO MEROTTO JUNIOR
Orientador - PPG Fitotecnia

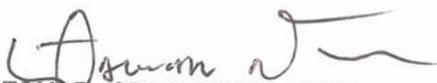
Homologado em: 25 NOV 2016
Por



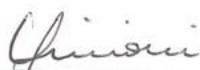
SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia



RIBAS ANTONIO VIDAL
PPG Fitotecnia/UFRGS



ITAMAR CRISTIANO NAVA
PPG Fitotecnia/UFRGS



CARINE SIMIONI
PPG Zootecnia/UFRGS



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

DEDICATÓRIA

A minha família pelos sábios ensinamentos e apoio ao longo da vida e aos amigos, pelo companheirismo e por garantir que houvesse uma vida, mesmo no mestrado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu pai Pedro Pisoni e mãe Sonia M. Bin Pisoni pela vida (apoio, dedicação, sabedoria, tempo, recursos, amor) proporcionada a mim até este momento.

Aos meus irmão Felipe Pisoni e Paula C. Pisoni pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas de PPG e, sobretudo amigos Giliardi Dalazen, Catarine Markus, Tiago E. Kaspary, Mateus Gallon e Everton Bortoly, André L. Vian, Cecília Giordano e demais colegas pelo apoio e auxílio durante estes dois anos.

Ao professor Aldo Merotto Junior pelos conhecimentos repassados, auxílio nos momentos difíceis e principalmente pela paciência, esta imprescindível para que chegássemos a este momento.

Aos amigos Rafael S. Rafaeli, Emanuel de Costa, Felipe Bertuol, Eduardo Carniel e Walker Schaidhauer, André L. Vian e Giliardi Dalazen por proporcionar momentos de companheirismo, diversão e festividades fora ao ambiente acadêmico.

A Deus, por ter guiado meus caminhos através dos obstáculos da vida e ter me trazido até onde estou neste momento.

TAXA DE FECUNDAÇÃO CRUZADA E SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM CAPIM-ARROZ E EFEITO DE TEMPERATURA EM CAPIM-ARROZ E BUVA RESISTENTES AOS HERBICIDAS

Autor: Alexandre Pisoni

Orientador: Aldo Merotto Junior

RESUMO

Plantas daninhas são um dos principais agentes causadores de redução de rendimento das culturas em todo o mundo. A buva e o capim-arroz estão entre as principais plantas daninhas das culturas de soja e arroz-irrigado, e ambas apresentam resistência a herbicidas. As características relacionadas a genética, fisiologia e biologia de plantas são conhecimentos básicos para o entendimento da evolução da resistência destas plantas aos herbicidas. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a dormência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) em relação ao efeito da idade pós-colheita e de diferentes métodos de superação da dormência; identificar a taxa de fecundação cruzada e estimar a produção de sementes em *E. crus-galli*; avaliar o efeito de estresses abióticos causados pela variação de temperatura em capim-arroz resistentes a imidazolinonas; e determinar o efeito da baixa temperatura em interação com sulfato de amônio na resistência de buva (*Conyza bonariensis*) ao herbicida glyphosate. Sementes de capim-arroz com um e dois anos apresentam germinação superior a 90%, no entanto as sementes com um dia e dois meses de idade após a colheita apresentam alto grau de dormência, apresentando germinação de 5,96% e 25,22%, respectivamente, apenas quando expostas a 40°C durante 7 dias. A taxa de fecundação cruzada média de *E. crus-galli* foi de 3,46%, variando de 2,96% a 4,41% em função do local de avaliação. A produção de sementes de *E. crus-galli* pode chegar a 23.107 sementes por planta, quando cultivadas em condições de campo a uma densidade de 1 planta/m². Condições de 16°C/16°C aumentaram a resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr, enquanto variações de temperatura que simulam um choque térmico (16°C/25°C e 25°C/16°C) diminuem a resistência destas plantas, aumentando sua sensibilidade a este herbicida. Temperatura de 12°C proporciona aumento de mais de 70% no controle de buva resistente ao glyphosate em comparação com temperatura de 25°C. Apesar de ser considerado como autógama, o capim-arroz possui altos níveis de fecundação cruzada, que em conjunto com alta dormência e produção de sementes, representam importantes características para a evolução e dispersão da resistência a herbicidas. A resistência aos herbicidas em capim-arroz e buva é afetada pela temperatura, o que dificulta o diagnóstico e favorece a dispersão deste problema.

FERTILIZATION RATE CROSS AND OVERCOMING DORMANCY IN GRASS RICE AND TEMPERATURE EFFECT IN BARNYARDGRASS AND HORSEWEED RESISTANT HERBICIDES

Author: Alexandre Pisoni
Adviser: Aldo Merotto Junior

ABSTRACT

Weeds are one of the main causes of crop grain yield reduction worldwide. Horseweed and barnyardgrass, respectively, are among the main weeds of soybean and irrigated-rice, and both exhibiting resistance to herbicides. Characteristics related to genetics, physiology and biology are basic knowledge for studying the herbicide resistance evolution on weeds. The objectives of this study were to study the seed dormancy of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) related to the influence of post-harvest age on the germination and different methods of breaking dormancy; identify the out-crossing rate and estimating seed production barnyardgrass at field conditions; evaluate the effect of abiotic stresses caused by temperature variation in barnyardgrass resistant to imidazolinones; evaluate the effect of low temperature in interaction with ammonium sulfate on horseweed (*Conyza bonariensis*) resistance to glyphosate. The germination of one and two years old barnyardgrass seeds is higher than 90%. However, one day and two months old seeds have high dormancy, which germination of 5.96% and 25.22%, respectively, is obtained only when exposed at 40°C for 7 days. The mean out-crossing rate of barnyardgrass was 3.46%, ranging from 2.96% to 4.41% depending on the location of evaluation. The production of *E. crus-galli* seeds can reach 23.107 seeds per plant when grown under field conditions at plant density of 1/m². Conditions of 16°C/16°C (before and after herbicide application) increased barnyardgrass resistance to the herbicide imazethapyr, and temperature of 16°C/25°C and 25°C/16°C, that simulate a thermal shock, decrease the herbicide resistance. Temperature of 12°C provides an increase of over 70% in the control of glyphosate-resistant horseweed compared to temperature 25°C. Although considered as self-fertilized, barnyardgrass has high levels of outcrossing, which together with high dormancy and seed production represent important features for the evolution and dispersion of herbicide resistance. The herbicide resistance in barnyardgrass and horseweed is affected by temperature, which makes diagnosis difficult and favors the spread of this problem.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
Capítulo 2 - AVALIAÇÃO DA IDADE PÓS-COLHEITA E MÉTODOS DE SUPERÇÃO DA DORMÊNCIA SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Echinochloa crus-galli</i>	6
RESUMO	6
ABSTRACT	7
2.1 INTRODUÇÃO	8
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
2.4 CONCLUSÕES	19
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
Capítulo 3 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE FECUNDAÇÃO CRUZADA E PROLIFICIDADE EM CAPIM-ARROZ (<i>Echinochloa crus-galli</i>)	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Material vegetal	30
3.2.2 Implantação e estabelecimento do experimento	31
3.2.3 Identificação das progênies resistentes	32
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.3.1 Taxa de fecundação cruzada	35
3.3.2 Vigor das plantas sobreviventes	38
3.3.3 Prolificidade do capim-arroz	41
3.3.4 Implicações no manejo e dispersão da resistência	42
3.4 CONCLUSÕES	43
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
Capítulo 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA EM CAPIM ARROZ RESISTENTE AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS	48

RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
4.1 INTRODUÇÃO.....	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.2.1 Material vegetal	52
4.2.2 Condução do experimento	53
4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	55
4.4 CONCLUSÕES.....	70
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
Capítulo 5 - EFEITO DA TEMPERATURA E INTERAÇÃO COM (NH₄)₂SO₄ NO	
CONTROLE DE BUVA RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLYPHOSATE	74
RESUMO.....	74
ABSTRACT.....	75
5.1 INTRODUÇÃO.....	76
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	78
5.2.1. Material vegetal	78
5.2.2. Condução do experimento	79
5.2.3. Avaliação e análise de dados.....	80
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.4 CONCLUSÕES.....	91
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
6 CONCLUSÕES GERAIS	95
6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
2.1. Porcentagem de germinação de sementes de <i>Echinochloa crus-galli</i> em função da idade pós-colheita e métodos de superação da dormência. Porto Alegre, 2015	14
2.2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>Echinochloa crus-galli</i> em função de sua idade pós-colheita e métodos de superação da dormência. Porto Alegre, 2015.....	17
2.3 Teste topográfico de tetrazólio de sementes de <i>Echinochloa crus-galli</i> em função de sua idade pós-colheita e métodos de superação da dormência. Porto Alegre, 2015	18
3.1 Tamanho da amostra em número de sementes, em função de três níveis de confiança (α) e três níveis de poder do teste	33
3.2. Classificação das plantas sobreviventes em função do vigor. Porto Alegre, 2015.....	34
3.3. Taxa de fecundação cruzada em capim-arroz obtida através da migração do gene ALS de resistência ao herbicida imazethapyr. Palmares do Sul, RS, 2015	36
3.4. Número de plantas sobreviventes a aplicação de imazethapyr em função das classes de vigor. Palmares do Sul, RS, 2015.....	39
3.5. Produção de sementes de <i>Echinochloa crus-galli</i> em condições de campo. Palmares do Sul, 2015.....	41
4.1 Tratamentos realizados no experimento do efeito de temperatura em capim-arroz resistente a herbicidas imidazolinonas.	54
4.2. Equação ^a utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C_{50}) ou 50% de redução do crescimento (GR_{50}) das plantas dos biótipos de capim-arroz resistentes e suscetíveis ao herbicida imazethapyr. Porto Alegre, 2015.....	56
5.1. Equações ^{ab} utilizadas para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C_{50}) ou 50% de redução do crescimento (GR_{50}) das	

plantas do biótipo de buva suscetível ao herbicida glyphosate. Porto Alegre, 2015	83
5.2. Equações ^{ab} utilizadas para determinar a dose necessária para obter% de controle (C ₅₀) ou 50% de redução do crescimento (GR ₅₀).....	
plantas do biótipo de buva resistente ao herbicida glyphosate.....	
Porto Alegre, 2015	86

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
2.1. Testes de tetrazólio em sementes de capim-arroz indicando a semente com embrião não viável (A) e embrião viável (B).	13
3.1. Esquema ilustrativo de cada área no experimento a campo relacionado a avaliação da taxa de fecundação em capim-arroz.....	32
3.2. Ilustração das diferenças de crescimento das plantas sobreviventes e não sobrevivente aos 21 dias após a aplicação do herbicida imazethapyr	34
3.3. Ilustração das plantas sobreviventes (setas pretas) e não sobreviventes (seta vermelha) aos 21 dias após a aplicação do herbicida imazethapyr	36
4.1. Eficiência de controle (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 7DAT. Porto Alegre, 2015.....	58
4.2. Eficiência de controle (%) de capim-arroz resistente pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 7DAT. Porto Alegre, 2015.....	59
4.3. Eficiência de controle (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 14DAT. Porto Alegre, 2015.....	61
4.4. Eficiência de controle (%) de capim-arroz resistente pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 14DAT. Porto Alegre, 2015.....	61
4.5. Eficiência de controle (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 21DAT. Porto Alegre, 2015.....	63

4.6. Eficiência de controle (%) de capim-arroz resistente pelo..... tratamento imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 21DAT. Porto Alegre, 2015.....	64
4.7. Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de capim-arroz... suscetível pelo herbicida imazethapyr em resposta a..... tratamento condições de temperatura. Porto Alegre, 2015.....	65
4.8. Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de capim-arroz... resistente pelo herbicida imazethapyr em resposta a..... tratamento condições de temperatura. Porto Alegre, 2015.....	66
5.1. Controle de plantas de buva suscetíveis ao glyphosate aos 7 (a), 14 (b) e 21 (c) dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (d) em resposta à temperatura (12°C e 25°C) e à adição de (NH ₄) ₂ SO ₄ à calda de pulverização de glyphosate	84
5.2. Plantas de buva suscetíveis ao glyphosate, aos 28 dias após a aplicação tratamentos, em resposta à temperatura de 12°C (a e c) e 25°C (b e d) e à adição de (NH ₄) ₂ SO ₄ (c e d) à calda de pulverização de glyphosate	85
5.3. Controle de plantas de buva resistentes ao glyphosate aos 7 (a), 14 (b) e 21 (c) dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (d) em resposta à temperatura (12°C e 25°C) e à adição de (NH ₄) ₂ SO ₄ à calda de pulverização de glyphosate	87
5.4. Plantas de buva resistentes ao glyphosate, aos 28 dias após a aplicação tratamentos, em resposta à temperatura de 12°C (a e c) e 25°C (b e d) e à adição de (NH ₄) ₂ SO ₄ (c e d) à calda de pulverização de glyphosate	88

1 INTRODUÇÃO GERAL

A presença de plantas daninhas é um dos principais fatores limitantes a obtenção de elevados rendimentos em espécies cultivadas. Plantas daninhas limitam a expressão do potencial genético da cultura principalmente devido aos efeitos da competição pelos recursos do ambiente. Uma das principais plantas daninhas e de grande importância na cultura do arroz-irrigado em todo o mundo é o capim-arroz (*Echinochloa ssp.*). De forma geral, infestações de 40 plantas m⁻² de *Echinochloa ssp.* reduzem o rendimento dos grãos de arroz em 50 a 70% (Carey, 1990; Fischer *et al.*, 1997). Em situações onde o controle dessas e outras plantas daninhas é insatisfatório, a redução no rendimento de grãos de arroz pode chegar a 35% (Oerke & Dehne, 2004), e na ausência de controle o prejuízo pode alcançar 90% (Andres & Machado, 2004).

Na cultura da soja, a buva possui o potencial de causar grandes prejuízos, sendo relatado que *Conyza canadensis*, na densidade de 150 plantas m⁻², reduziu em 83% a produtividade da soja em sistema de semeadura direta (Bruce & Kells, 1990). Outros autores afirmam que a competição com esta infestante pode reduzir a produtividade da soja entre 10 e 40%, dependendo das condições do ambiente (Adegas *et al.*, 2011).

O controle das plantas daninhas na cultura do arroz-irrigado e da soja na maioria das áreas é realizado através da utilização de herbicidas. Devido à pressão de seleção causada pelos herbicidas, populações de plantas daninhas tem apresentado resistência a herbicidas de diferentes mecanismos de ação em praticamente todo o mundo (Powles & Yu, 2010; Heap, 2015). Com o surgimento do arroz tolerante aos herbicidas imidazolinonas (Clearfield®) e da soja geneticamente modificada resistente ao herbicida glyphosate (soja RR®) houve um aumento do uso desses herbicidas, que de forma contínua e juntamente com o manejo inadequado das lavouras, contribuem para a seleção

de biótipos de capim-arroz e buva resistentes a estes herbicidas (Merotto Jr. *et al.*, 2009; Mariot *et al.*, 2010; Sansom *et al.*, 2013; Lamego *et al.*, 2013; Machado, 2014).

Os mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas estão relacionados principalmente com a ocorrência de mutações ou super-expressão do gene que codifica a enzima alvo, diminuição da absorção e translocação, aumento da metabolização do herbicida e sequestro no vacúolo (Yuan *et al.*, 2007). O mecanismo mais frequente de resistência a herbicidas ocorre devido à mutação no local de ação que resulta em mudanças na conformação da enzima alvo e diminuição do impacto do herbicida sobre a planta (Powles & Yu, 2010).

Vários fatores influenciam a velocidade da evolução da resistência, incluindo fatores relacionados ao agro-ecossistema, aos herbicidas, e fatores relacionados à genética e biologia das plantas daninhas, sendo que estes últimos estão entre os principais responsáveis pela evolução e adaptação de plantas resistentes. Entre os principais fatores genéticos estão a frequência de genes de resistência, número de genes envolvidos, nível de dominância dos genes de resistência e capacidade adaptativa dos mesmos (Smith *et al.*, 2015).

Quanto aos fatores relacionados à biologia das espécies destacam-se o sistema de fecundação, prolificidade, longevidade das sementes no banco de sementes do solo e a capacidade de dispersão de sementes e pólen (Powles & Yu, 2010). A dispersão de grãos de pólen durante a fase reprodutiva possui grande relevância na evolução da resistência a herbicidas. Este sistema de fecundação está associado, ao fluxo gênico e possibilita a dispersão dos alelos de resistência para plantas suscetíveis (Latta *et al.*, 1998). A prolificidade das plantas e dormência das sementes apresentam elevada relevância na dinâmica de populações de plantas daninhas, pois favorece a perpetuação das espécies na lavoura e contribui para a manutenção do banco de sementes do solo, que é a maior fonte de novas plantas na lavoura e ocasiona altas infestações nas áreas cultivadas com arroz-irrigado (Avila *et al.*, 2005). Estes conhecimentos são importantes para a definição de estratégias correlacionadas de prevenção e controle da resistência aos herbicidas em plantas daninhas.

O conhecimento dos fatores que limitam o desempenho dos herbicidas permite selecionar os momentos de aplicação mais apropriados para sua

eficácia, otimizar a dose aplicada e reduzir o custo de produção. Dentre os diversos fatores que afetam a eficácia dos herbicidas, destacam-se os fatores ambientais (abióticos), principalmente a temperatura, umidade do solo e do ar e luz, apresentam grande efeito na dinâmica do herbicida na planta em relação a sua absorção, translocação, metabolização e atividade no local de ação (Barry, 2011).

Espera-se que as respostas ao estresse, seja biótico ou abiótico, sejam mais eficazes e mais pronunciadas em plantas que possuem maior capacidade de manter seu metabolismo ativo, sendo que plantas cultivadas sob determinadas condições de estresses abióticos podem apresentar diferenças significativas quanto à resposta a aplicação de herbicidas, podendo até mesmo alterar seu nível de resistência a estes produtos (Kosová *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2011; Vila-Aiub *et al.*, 2012).

O entendimento das características relacionadas à genética, fisiologia e biologia de plantas daninhas apresentam grande relevância para o estudo da resistência destas plantas aos herbicidas. É por meio destes estudos que se obtém um maior conhecimento e melhor entendimento dos mecanismos que conferem a resistência, assim como de fatores relacionados à dispersão e evolução da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a dormência de capim-arroz em relação ao efeito da idade pós-colheita e de diferentes métodos de superação da dormência; identificar a taxa de fecundação cruzada e estimar a produção de sementes em *E. crus-galli*; avaliar o efeito de estresses abióticos causado pela variação de temperatura em capim-arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas; e determinar o efeito da baixa temperatura em interação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na resistência de buva (*Conyza bonariensis*) ao herbicida glyphosate.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGAS, F. S. *et al.* Manejo de buva resistente ao glyphosate. **Revista DBO Agrotecnologia**, v. 1, n. 3, p. 24-32, 2011.

ANDRES, A.; MACHADO, S. L. de O. Plantas daninhas em arroz irrigado. In:

MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; GOMES, A. da S. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap. 15, p. 457-546.

ÁVILA, L. A. *et al.* Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp.) and imidazolinone tolerant/resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management Science**, v. 61, n. 2, p. 171-178, 2005.

BRUCE, J. A.; KELLS, J. J. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with pre plant and pre-emergence herbicides. **Weed Technology**, v. 4, n. 3, p. 642-647, 1990.

CAREY, V. F. **Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and bearded sprangletop (*Leptochloa fascicularis*) interference and control in rice (*Oryza sativa*)**. 1990. M.S. thesis - University of Arkansas, Fayetteville, AR, 1990.

FISCHER, A. *et al.* Suppression of junglerice [*Echinochloa colona* (L.) Link] by irrigated rice cultivars in Latin America. **Agronomy Journal**, Madison, v. 89, n. 3, p. 516-521, 1997.

GE, Xia *et al.* Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by 31PNMR. **Pest Management Science**. v. 67, p. 1215-1221, 2011.

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. acesso em: 10 de julho de 2015.

KOSOVÁ, K. *et al.* Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, 2011.

LAMEGO, F.P. *et al.* Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 433-442, 2013.

LATTA, R.G., *et al.* Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution**, v. 52, n. 1, p. 61-67, 1998.

MACHADO, R. T. **Emergência, distribuição especial e manejo de buva resistente ao herbicida glyphosate**. Santa Maria: UFSM, 2014. 56p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MARIOT, C. H. P. *et al.* Resistência múltipla e cruzada de capim-arroz aos herbicidas na cultura de arroz no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS DANINHAS, 27, 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 1455-1459.

MEROTTO JR., A. *et al.* Resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Palotti, 2009. p. 312-315.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production - losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, Guildford, v.23, n.4, p.275-285, 2004.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

SANSOM, M. *et al.* Control of *Conyza* spp. with Glyphosate: A Review of the Situation in Europe. **Plant Protect Science**, v. 49, n. 1, p. 44-53, 2013.

SMITH, C. *et al.* Experimental Methods to Study Gene Flow. **Weed Science**, v. 63, n. 1, p. 12-22, 2015.

VILA-AIUB, M. *et al.* Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. **Pest Management Science**. v. 69, p. 228-232, 2012.

YUAN, J. S. *et al.* Non-target-site herbicide resistance: a family business. **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

Capítulo 2 - AVALIAÇÃO DA IDADE PÓS-COLHEITA E MÉTODOS DE SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Echinochloa crus-galli*

RESUMO

As sementes de capim-arroz apresentam diferentes taxas de germinação devido a presença de dormência, sendo que a intensidade e duração desta, variam de acordo com o biótipo e condições ambientais. A realização de trabalhos de pesquisa com capim-arroz depende da obtenção de plantas a partir de sementes, e desta forma é necessário o conhecimento das características da dormência nesta espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da idade pós-colheita sobre a germinação de sementes de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) e a resposta destas a diferentes métodos de superação da dormência. Avaliou-se a porcentagem de germinação (G) e o índice de velocidade de germinação (IVG) em lotes de sementes apresentando quatro diferentes idades pós-colheita (dois anos, um ano, dois meses e um dia pós-colheita) submetidas a 15 tratamentos de superação da dormência. Métodos de superação de dormência foram relacionados com a variação de temperatura, H₂SO₄, KNO₃ e giberelina. Sementes de um ano e dois anos apresentam germinação superior a 90%, no entanto as sementes com um dia e dois meses de idade após a colheita apresentam aumento da germinação de 5,96% e 25,22%, respectivamente, apenas quando expostas a 40°C durante sete dias. Dormência das sementes é um fator importante para o cultivo de capim-arroz em condições experimentais. Sementes recém colhidas apresentam altos níveis de dormência, sendo que métodos específicos são parcialmente eficazes na superação da dormência das sementes.

Chapter 2 - EVALUATION THE POST-HARVEST AGE AND BREAKING DORMANCY METHODS ON THE SEED GERMINATION OF BARNYARDGRASS (*Echinochloa crus-galli*)

ABSTRACT

Barnyardgrass seeds have different germination rates due to the seed dormancy. Intensity and duration of barnyardgrass seed dormancy is affected by the biotype and environmental conditions. Research activities with barnyardgrass depends on the production of plants from seeds, and thus the knowledge of characteristics and manipulation of seed dormancy is required. The objectives of this study were to study the seed dormancy of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) related to the influence of post-harvest age on the germination and different methods of breaking dormancy. Seed germination in seed lots presenting four different post-harvest ages (two years, one year, two months and one day after harvest) and 15 breaking dormancy methods were evaluated. Dormancy breaking methods were related to the variation of temperature, and H₂SO₄, KNO₃ and gibberellins. Germination of one and two years old seeds were greater than 90%, However, one day and two months old seeds had increased germination to 5.96% and 25.22%, respectively, only when exposed to 40 °C for 7 days. Seed dormancy's an important factor for barnyardgrass plant growing in experimental conditions. Recent harvest seeds have high levels of seed dormancy and specific methods are partially effective for breaking seed dormancy.

2.1 INTRODUÇÃO

O capim-arroz (*Echinochloa* spp.) é uma das plantas daninhas mais problemáticas de lavouras de arroz-irrigado (*Oryza sativa* L.) do Sul do Brasil e de demais áreas que produzem esta cultura. As espécies do gênero *Echinochloa* são consideradas a sexta planta daninha mais importante do mundo, estando presente como espécie infestante em diversas culturas além do arroz, como algodão (*Gossypium hirsutum* L.), milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), e outros (Holm *et al.*, 1991; HEAP, 2015).

O capim-arroz possui elevada importância devido a grande capacidade de adaptação, ampla distribuição, alta capacidade de germinação sob déficit hídrico e grande plasticidade com relação à temperatura de germinação (Andres & Machado, 2004; Agostinetto & Vargas, 2009). As sementes de capim-arroz apresentam longa viabilidade, podendo apresentar 100% de germinação mesmo após serem acondicionados durante sete anos em condições ótimas, e de 90% após três anos no solo (Kissmann, 1997).

As sementes da maioria das plantas podem apresentar variáveis taxas de germinação, devido à presença de dormência, sendo que o biótipo e as condições ambientais são determinantes na intensidade e duração desta dormência (Delatorre, 1999; Guillemin *et al.*, 2013). Além disso, juntamente com sua capacidade de se manter viável no solo, a dormência pode ser problemática em locais experimentais, dificultando a realimentação de experimentos pela baixa germinação das sementes e também facilitar a contínua realimentação do banco de sementes do solo.

A dormência proporciona a germinação em diferentes períodos do ano, sendo uma característica evolutiva favorável em especial a plantas daninhas

(Delatorre, 1999). A dormência pode ser o resultado de diversas interações entre o pericarpo, o embrião e as demais estruturas que envolvem a semente. Ainda, pode ocorrer limitações físicas ou até mesmo bloqueios metabólicos em diversas rotas e mecanismos, sendo que a manutenção da mesma depende das condições pós-colheita às quais são submetidas (Delatorre, 1999). Estas condições podem facilitar a degradação de polipeptídeos associados à dormência, e induzir ou ativar proteínas requeridas para a rápida degradação de RNAs associados à mesma (Li & Foley, 1996). Em sementes recém-colhidas, a entrada de água nos tecidos dificulta a absorção de oxigênio, sendo que o armazenamento da semente seca por um determinado período promove a difusão do O₂ para o interior do pericarpo, determinando a redução na quantidade de inibidores da germinação e favorecendo a superação da dormência (Hallett & Bewley, 2002).

A dormência pode ser determinada pelo desequilíbrio entre os hormônios reguladores de crescimento, atuando direta ou indiretamente no metabolismo dos carboidratos, proteínas e outras reservas das sementes. Desta forma, existe um balanço complexo envolvendo inibição e estímulos responsáveis pela dormência, associada à sensibilidade das células em receber estímulos de inibidores e promotores, uma vez que reguladores como citocininas, auxinas e giberelinas podem induzir a germinação (Ketring, 1973; Miyoshi & Sato, 1997; Vieira *et al.*, 2002). Em capim-arroz pertencente a espécie *E. crus-galli* foi constatada alta correlação positiva entre a dormência das sementes e a lipofilicidade das membranas que as envolviam. Ainda, quando submetidas a tratamento com n-propanol houve interações do álcool com a camada lipídica da membrana, reduzindo a dormência (Taylorson, 1988; Hallett & Bewley, 2002). A estabilidade do pericarpo em relação aos processos físicos e a variação do metabolismo em relação à dinâmica hormonal, por exemplo, podem estar associados a variação temporal da dormência. Desta forma, o período após a maturação e colheita das sementes está associado com a intensidade da dormência e a sensibilidade das sementes aos métodos artificiais de superação da dormência.

Os diversos métodos de superação da dormência apresentam resultados contrastantes e variados, sendo que sua eficácia varia em função da espécie utilizada, do biótipo, da idade das sementes, e das condições e

substâncias químicas as quais as sementes são submetidas. Nas espécies de plantas daninhas do gênero *Ipomoea* e *Merremia*, a superação de dormência foi testada através da utilização de ácido sulfúrico concentrado, nitrato de potássio, água quente, calor seco, escarificação mecânica e fogo, sendo que destes, apenas o nitrato de potássio e a escarificação mecânica não foram eficientes na superação da dormência (Azania *et al.*, 2003). A pré-secagem a 60°C por 72 horas mostrou-se eficiente na superação da dormência de sementes de arroz, o que não ocorreu em temperaturas de 70 e 80°C, onde as sementes são afetadas negativamente pela alta temperatura (Menezes *et al.*, 2009).

Para o gênero *Echinochloa* sp. especificamente, as temperaturas de 15 a 30°C e 9,5 a 31°C proporcionaram os maiores níveis de germinação para *E. crus-galli* e *E. phyllopogon* respectivamente (Boddy *et al.*, 2012; Sadeghloo, 2013). Além dos métodos de superação de dormência em geral, o período pós colheita das sementes apresenta grande influência no nível de dormência das mesmas. Independentemente das temperaturas avaliadas (17 a 35°C), quanto maior o período de armazenamento das sementes de *E. crus-galli* maior a porcentagem de germinação destas, variando de 2,4% a 52,2% para sementes de 1 e 8 anos, respectivamente (Martinková *et al.*, 2006). Além disto, a associação de métodos de superação da dormência pode trazer vantagens quando a utilização de vários métodos isolados não resultam na germinação das sementes. Através da imersão das sementes durante 3 dias em etanol (0,25M) no escuro (35/37°C), e posterior tratamento onde as sementes foram germinadas durante 14 dias a 20/30°C (16/8 horas), obteve-se germinação superior a 80% em algumas populações de *E. crus-galli*. No entanto, estes procedimentos não diminuíram (nesta mesma magnitude) a dormência para outras populações (Kovach *et al.*, 2012).

A dormência em sementes de *E. crus-galli* pode também ser induzida por condições do meio e/ou por práticas de manejo (dormência secundária). Sementes enterradas no outono apresentaram redução de 46% e 17% na germinação quando enterradas a uma profundidade de 0,1 m e 0,02 m, respectivamente (Martinková & Honěk, 2013). Neste estudo, quando as mesmas foram enterradas no outono, apresentaram 93% de germinação quando comparadas a sementes enterradas na primavera (46%). Estas

diferenças na germinação, assim como a dificuldade de germinar quando enterradas em maiores profundidades podem ser causadas pela indução da dormência através do fotoperíodo e/ou estímulos de temperatura (Pons, 1991; Saatkamp *et al.* 2011). O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do período pós-colheita sobre a germinação de sementes de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) e a resposta destas à diferentes métodos de superação da dormência.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O delineamento experimental foi o completamente casualizado, organizado em esquema fatorial, com quatro repetições de 100 sementes de capim-arroz (*E. crus-galli*). Cada unidade experimental constou de uma placa de petri contendo três camadas de papel filtro previamente esterilizado. O fator A correspondeu à quatro diferentes idades pós-colheita (dois anos, um ano, dois meses e um dia pós-colheita) e o fator B a 15 tratamentos de superação da dormência. Com exceção das sementes recém-colhidas (um dia), as demais foram armazenadas em local sem presença de umidade a uma temperatura de 25°C. Os tratamentos de superação de dormência foram baseados em estudos realizados em *Echinochloa* spp. (Yamasue *et al.*, 1977; Maun, 1977; Rizk *et al.*, 1978; Watanabe, 1978; Boddy *et al.*, 1999; Honek *et al.*, 1999; Guillemain *et al.*, 2013; Martinková & Honěk, 2013), onde selecionou-se os tratamentos que apresentaram os melhores resultados de superação de dormência. Os tratamentos foram:

T1 - Testemunha: sete mL de água destilada;

T2 - Ácido giberélico (GA₃): foram avaliados quatro formas de exposição das sementes ao GA₃. T2_a e T2_b correspondem a sementes submersas em solução de GA₃ a 0,05 e 0,10 %, respectivamente, por 24 horas, e após depositadas na placa de petri. T2_c e T2_d correspondem a sementes submersas em solução de GA₃ a 0,05 e 0,10 %, respectivamente, até o final das avaliações;

T3 - Nitrato de potássio (KNO₃) + baixa temperatura: as sementes permaneceram em solução de KNO₃ a 0,2% por 24 horas. Posteriormente as mesmas foram lavadas com água destilada e transferidas para placas de petri contendo papel filtro e 5 ml de água destilada, onde foram armazenadas à temperatura de 5°C durante sete dias;

T4 - Água quente: as amostras permaneceram submersas em água a 40°C durante 24 horas;

T5 - Ácido sulfúrico (H₂SO₄): as sementes foram submersas em H₂SO₄ (96%, 36N) por 3 minutos (T5_a) ou 5 minutos (T5_b). Posteriormente foram lavadas com água destilada;

T6 - Alta temperatura: as amostras permaneceram em estufa com ventilação de ar à temperatura de 40°C durante sete dias;

T7 - Baixa temperatura: as sementes foram armazenadas em placas de petri contendo papel filtro e sete ml de água à uma temperatura de 5 °C por sete dias;

T8 - Submersão em água: as amostras permaneceram submersas em água durante 24 horas;

T9 - Choque térmico: as amostras foram armazenadas durante sete dias a uma temperatura de 5°C e posteriormente transferidas para estufa com ventilação de ar a temperatura de 40°C por 48 horas;

T10 - Submersão + KNO₃: as sementes foram submersas em solução de KNO₃ a 0,2% (T10_a) ou 0,4% (T10_b), onde permaneceram até o final das avaliações;

Com exceção dos tratamentos T2_c, T2_d, T10_a e T10_b, o restante das amostras, após serem submetidas aos diferentes tratamentos supracitados, foram transferidas para placas de petri contendo três camadas de papel filtro esterilizado e sete mL de água destilada, e posteriormente mantidas em ambiente controlado com temperatura de 25 °C e luz constante até o final das avaliações.

A avaliação constou da contagem diária das sementes germinadas com a finalidade de determinar o índice de velocidade de germinação (IVG) conforme metodologia descrita por Maguire (1962). Ao final das contagens (45 dias) foi determinado o percentual de germinação (G). As sementes não germinadas foram avaliadas através do teste topográfico de tetrazólio adaptado

de MAPA (2009) para *Urochloa* spp. a fim de se determinar a viabilidade de sementes potencialmente dormentes (Figura 2.1).

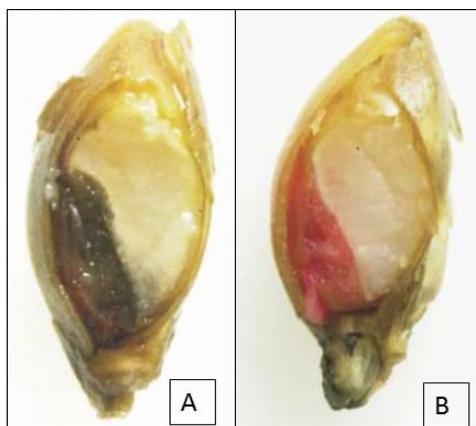


FIGURA 2.1. Testes de tetrazólio em sementes de capim-arroz indicando a semente com embrião não viável (A) e embrião viável (B).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, transformados para \sqrt{x} , e posteriormente analisados em relação aos pressupostos da ANOVA. Após, os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A germinação das sementes apresentou diferenças significativas tanto para os tratamentos de superação da dormência como para as diferentes idades pós-colheita das sementes (Tabela 2.1). As sementes cujos períodos pós-colheita foram mais prolongados (dois anos e um ano) apresentaram os maiores valores de germinação em relação as sementes recém colhidas (dois meses e um dia). Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores nesta espécie, onde afirma-se que sementes recém-colhidas de *E. crus-galli* possuem dormência primária, que pode ser superada por um período de armazenamento prolongado (Koller *et al.*, 1962).

Em sementes recém-colhidas, o imediato processo de germinação pode ser afetado por barreiras físicas e fisiológicas, pois a entrada de água nos

tecidos dificulta a absorção de oxigênio. Portanto, com o armazenamento da semente seca por um determinado período ocorre a difusão do O₂ para o interior da semente, determinando a redução na quantidade de inibidores da germinação e favorecendo a superação da dormência (Olatoye & Hall, 1973).

As sementes de capim-arroz, armazenadas por período superior a um ano apresentam elevada germinação, enquanto que as sementes armazenadas por um ou dois anos não apresentaram resposta aos métodos de superação de dormência (Tabela 2.1). Para estas sementes, a maioria dos tratamentos apresentou germinação superior a 90%. A única exceção foi para sementes de um ano submersas em água durante 24 horas (T8), onde a porcentagem de germinação foi reduzida, quando comparada aos demais tratamentos de superação da dormência (Tabela 2.1). Em sementes de *Echinochloa* sp. armazenadas por diferentes períodos de tempo observam-se acréscimos de germinação de 58,74 e 89,00% ao serem avaliadas um, dois e três anos após a colheita respectivamente (Rahn *et al.*, 1968).

TABELA 2.1. Porcentagem de germinação de sementes de *Echinochloa crus-galli* em função da idade pós-colheita e de métodos de superação da dormência. Porto Alegre, 2015.

TRATAMENTO	Período pós-colheita			
	2 ANOS	1 ANO	2 MESES	1 DIA
T1 - Testemunha	A 96,87 a*	A 90,62 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T2 _a - GA ₃ 0,05% 24h	A 93,14 a	A 97,3 a	B 0,00 b	B 0,75 b
T2 _b - GA ₃ 0,10% 24h	A 97,02 a	A 98,01 a	B 0,75 b	B 0,25 b
T2 _c - GA ₃ 0,05% final	A 99,39 a	A 99,45 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T2 _d - GA ₃ 0,10% final	A 98,31 a	A 97,27 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T3 - KNO ₃ + temperatura	A 98,93 a	A 98,14 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T4 - Água quente	A 98,77 a	A 93,43 a	B 0,00 b	B 0,50 b
T5 _a - H ₂ SO ₄ 3 min	A 92,12 a	A 95,01 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T5 _b - H ₂ SO ₄ 5 min	A 98,98 a	A 96,24 a	B 2,06 b	B 0,00 b
T6 - Alta temperatura	A 98,37 a	A 97,04 a	B 25,22 a	C 5,96 a
T7 - Baixa temperatura	A 90,31 a	A 92,66 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T8 - Submersão em água	A 96,15 a	B 80,08 b	C 0,00 b	C 0,00 b
T9 - Choque térmico	A 95,15 a	A 93,72 a	B 0,00 b	B 0,00 b
T10 _a - Submersão + KNO ₃ 0,2%	A 95,83 a	A 95,55 a	B 0,29 b	B 0,00 b
T10 _b - Submersão + KNO ₃ 0,4%	A 91,12 a	A 92,67 a	B 0,00 b	B 0,00 b
MÉDIA	96,03	94,48	1,89	0,50
CV (%)	9,56			

* Médias antecedidas pela mesma letra maiúsculas na linha ou seguidas de letras minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Nas sementes avaliadas em períodos de um dia e dois meses após a colheita observa-se resposta aos tratamentos apenas quando as mesmas foram expostas por sete dias a 40°C (T6), apresentando percentual de germinação de 25,22 e 5,96 respectivamente (Tabela 2.1). Os dados comprovam que a germinação de sementes de capim-arroz é influenciada pela temperatura, variando em função da população, faixas de temperatura e condições do experimento. Sob condições de baixa temperatura, a melhor temperatura observada para a superação da dormência de capim-arroz foi 10°C para *E. crus-galli* var. *praticola* (Watanabe, 1978). No entanto, a germinação de sementes de *E. crus-galli* não foi reduzida pela exposição a temperaturas de 60 e 80°C por uma hora, mas a exposição a 100°C durante o mesmo período de tempo reduziu significativamente a germinação das mesmas, devido a morte do embrião (Maun, 1977).

Em condição de alta temperatura, similar ao tratamento T6, quando ocorridas a campo, as sementes de *Echinochloa crus-galli* podem sofrer alterações cíclicas na porcentagem da germinação. Variações causadas pelo término da dormência das sementes após serem expostas a alterações climáticas distintas (resfriamento ou aquecimento) e/ou indução da dormência secundária por condições opostas resultam em germinação variável de 0% a 96% (Baskin & Baskin, 1985; Honek *et al.*, 1999). No entanto, as faixas de temperatura para germinação de *E. crus-galli* são variáveis, apresentando diferentes percentuais de germinação dependendo da temperatura a qual as sementes são expostas. A temperatura base para germinação de *E. crus-galli* foi 6,2 °C, sendo que a máxima germinação ocorreu com temperaturas entre 10 e 25 °C, diminuiu entre 25 e 35 °C e foi totalmente restrita a 5 °C (Guillemin *et al.*, 2013).

A escarificação química das sementes (T5_a e T5_b) não promoveu aumento significativo da germinação nas sementes dos lotes de dois meses e um dia, evidenciando a ausência de dormência física das mesmas (Tabela 2.1). Da mesma forma, os tratamentos químicos utilizados proporcionaram efeito neutro nas sementes de capim-arroz, independentemente da idade das mesmas.

A dormência fisiológica pode ser regulada por inúmeros mecanismos, sendo necessário muitas vezes a ativação ou desativação de determinadas

rotas metabólicas para que haja o estímulo do processo germinativo. Dentro deste preceito, o tratamento químico das sementes com o intuito de redução do período de dormência das mesmas pode proporcionar resultados satisfatórios em determinados casos. Trabalhos avaliando diferentes tratamentos químicos promoveram o aumento da germinação de sementes de *E. crus-galli* das seguintes formas: tratamento químico com uréia e nitrato de potássio (Moursi *et al.*, 1919); tratamento com GA₃ (Rizk *et al.*, 1978); escarificação química com H₂SO₄ (Yamasue *et al.*, 1977) e imersão em nitrogênio líquido a -196 °C durante 5 min (Jordan *et al.* 1983).

A idade das sementes após a colheita afeta significativamente o nível de dormência e conseqüentemente a porcentagem de germinação das mesmas, sendo que quanto menor o intervalo decorrido entre a colheita das sementes e a avaliação das mesmas (um dia após colheita) menor foi a porcentagem de germinação destas (Tabela 2.1). Resultado similar foi observado quando avaliou-se sementes de *E. crus-galli* armazenadas por um e oito anos, onde a dormência diminui a partir de dois anos de idade, apresentando menos de 5% de germinação quando avaliadas no primeiro ano (Martinková *et al.*, 2006). Também, maior germinação foi observada em sementes de *E. crus-galli* armazenadas durante oito meses quando comparadas a sementes recém colhidas, apresentando 44,7% e 0,3% de germinação respectivamente (Rahn *et al.*, 1968).

O tipo de dormência que as sementes possuem apresenta grande relevância na persistência e intensidade da mesma. A dormência primária (sementes após a maturação) tende a responder melhor aos tratamentos de superação de dormência quando comparadas a dormência secundária (induzidas), sendo que quando expostas a temperaturas de 25°C e 5°C houve maior porcentagem de germinação de sementes de *E. crus-galli* contendo dormência primária (Honek *et al.*, 1999). No entanto, os resultados observados no presente estudo demonstram que mesmo possuindo dormência primária, as sementes de *E. crus-galli*, com idade pós-colheita menor ou igual a dois meses não apresentam respostas aos diversos tratamentos de superação da dormência a qual as sementes foram submetidas, com exceção do tratamento em que foram expostas a 40 °C durante sete dias (Tabela 2.1).

As avaliações do índice de velocidade de germinação (IVG)

demonstraram que, na média dos tratamentos, as sementes armazenadas por maiores períodos de tempo (dois anos e um ano) apresentaram os maiores valores de IVG, de 9,59 e 9,45 respectivamente, quando comparadas às amostras colhidas dois meses (0,10) e um dia antes da avaliação (0,05) (Tabela 2.2). Em relação as sementes armazenadas por um período maior de tempo (um e dois anos), apenas as sementes de um ano de idade que foram submetidas à submersão em água por 24 horas (T8) diferiram estatisticamente dos demais tratamentos de superação da dormência, proporcionando a redução do IVG para 8,01, o que sugere que o tratamento por submersão em água por 24h pode não ser o mais adequado quando comparado aos demais tratamentos.

TABELA 2.2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Echinochloa crus-galli* em função da sua idade pós-colheita e dos métodos de superação da dormência. Porto Alegre, 2015.

TRATAMENTO	Período pós-colheita			
	2 ANOS	1 ANO	2 MESES	1 DIA
T1 - Testemunha	A 9,68 a	A 9,06 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T2 _a - GA ₃ 0,05% 24h	A 9,31 a	A 9,73 a	B 0,00 a	B 0,07 a
T2 _b - GA ₃ 0,10% 24h	A 9,72 a	A 9,81 a	B 0,07 a	B 0,02 a
T2 _c - GA ₃ 0,05% final	A 9,93 a	A 9,94 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T2 _d - GA ₃ 0,10% final	A 9,83 a	A 9,72 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T3 - KNO ₃ + temperatura	A 9,89 a	A 9,81 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T4 - Água quente	A 9,87 a	A 9,34 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T5 _a - H ₂ SO ₄ 3 min	A 9,21 a	A 9,51 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T5 _b - H ₂ SO ₄ 5 min	A 9,59 a	A 9,62 a	B 0,21 a	B 0,00 a
T6 - Alta temperatura	A 9,84 a	A 9,71 a	B 2,52 a	B 0,59 a
T7 - Baixa temperatura	A 9,08 a	A 9,27 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T8 - Submersão em água	A 9,63 a	B 8,01 b	C 0,00 a	C 0,00 a
T9 - Choque térmico	A 9,62 a	A 9,37 a	B 0,00 a	B 0,00 a
T10 _a - Submersão + KNO ₃ 0,2%	A 9,58 a	A 9,55 a	B 0,02 a	B 0,00 a
T10 _b - Submersão + KNO ₃ 0,4%	A 9,11 a	A 9,26 a	B 0,00 a	B 0,00 a
MÉDIA	9,59	9,45	0,19	0,05
CV (%)	7,67			

** Médias antecedidas pela mesma letra maiúsculas na linha ou seguidas de letras minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

As avaliações de índice de velocidade de germinação consistem em importantes ferramentas para caracterizar a uniformidade de germinação, com ótima taxa de germinação, em menor tempo. O IVG permite inferir que no caso de sementes com um e dois anos de idade possuem uma grande quantidade

de indivíduos com potencial para rápido e uniforme estabelecimento, em condições de campo.

As avaliações das sementes não germinadas foram avaliadas através do teste topográfico de tetrazólio. Os resultados demonstraram que em todos os tratamentos mais de 95% das sementes foram classificadas como viáveis (Tabela 2.3), o que demonstra a presença de elevado grau de dormência em sementes recém-colhidas (dois meses e um dia), e indica que a não germinação não ocorreu devido a morte do embrião das sementes. O teste de tetrazólio apresenta baixa correlação com o teste de porcentagem de germinação quando em sementes que apresentam alto grau de dormência (dois meses e um dia), pois apesar de a viabilidade ser avaliada por meio deste, o teste topográfico de tetrazólio não indica a intensidade da dormência das sementes e, nem sempre é sinônimo de germinação (Pariz *et al.*, 2010).

TABELA 2.3 Teste topográfico de tetrazólio de sementes de *Echinochloa crus-galli* em função da idade pós-colheita e dos métodos de superação da dormência. Porto Alegre, 2015.

TRATAMENTO	Viabilidade (%)			
	Período pós-colheita			
	2 ANOS	1 ANO	2 MESES	1 DIA
T1 - Testemunha	A 96,00 a*	A 95,62 a	A 96,87 a	A 97,62 a
T2 _a - GA ₃ 0,05% 24h	A 98,14 a	A 97,30 a	A 96,18 a	A 97,30 a
T2 _b - GA ₃ 0,10% 24h	A 97,50 a	A 98,01 a	A 97,02 a	A 98,01 a
T2 _c - GA ₃ 0,05% final	A 99,00 a	A 99,45 a	A 99,39 a	A 99,45 a
T2 _d - GA ₃ 0,10% final	A 98,00 a	A 97,27 a	A 98,31 a	A 97,27 a
T3 - KNO ₃ + temperatura	A 98,03 a	A 98,14 a	A 98,93 a	A 98,14 a
T4 - Água quente	A 97,77 a	A 96,98 a	A 98,77 a	A 97,43 a
T5 _a - H ₂ SO ₄ 3 min	A 96,12 a	A 98,01 a	A 97,66 a	A 97,01 a
T5 _b - H ₂ SO ₄ 5 min	A 98,98 a	A 96,24 a	A 95,98 a	A 96,24 a
T6 - Alta temperatura	A 98,37 a	A 97,04 a	A 98,37 a	A 97,04 a
T7 - Baixa temperatura	A 96,31 a	A 95,90 a	A 97,31 a	A 96,66 a
T8 - Submersão em água	A 96,20 a	A 97,08 a	A 96,15 a	A 97,50 a
T9 - Choque térmico	A 95,15 a	A 97,65 a	A 95,15 a	A 98,79 a
T10 _a - Submersão + KNO ₃ 0,2%	A 95,83 a	A 96,55 a	A 95,83 a	A 95,89 a
T10 _b - Submersão + KNO ₃ 0,4%	A 97,12 a	A 98,69 a	A 97,12 a	A 96,67 a
MÉDIA	97,23	97,33	97,27	97,40
CV (%)	5,54			

*Médias antecedidas pela mesma letra maiúsculas na linha ou seguidas de letras minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Além das características ligadas a dormência em si, os resultados

observados, principalmente nas sementes de um dia e dois meses de idade podem ser resultados de resposta das plantas a condições de estresse em seu desenvolvimento vegetativo e/ou reprodutivo, sendo que a característica e intensidade da dormência poderia ser um meio de sobrevivência em condições adversas do meio. Sementes de *E. crus-galli* por exemplo, quando expostas a condições de estresse hídrico e limitações de oxigênio na fase de desenvolvimento, podem reduzir a germinação de suas sementes em mais de 80% e 30%, respectivamente, quando avaliadas logo após a colheita, além de retardar a velocidade de germinação das mesmas (Boddy *et al.*, 2013). No presente estudo, as sementes dos diferentes períodos após a colheita foram obtidas de plantas crescendo em mesmo ambiente, diminuindo assim, o efeito ambiental da planta mãe sobre a dormência das sementes produzidas.

A característica de alto e variável grau de dormência observado em sementes da espécie *E. crus-galli* possui grande efeito no manejo desta planta daninha em áreas cultiváveis, pois apresenta ciclos de germinação variados assim como diferenças na duração da dormência das sementes. Proporciona maior persistência destas sementes no banco de sementes do solo, dificuldade de controle por métodos físicos, além de germinação desuniforme e contínua durante o ano, já que no banco de sementes encontram-se sementes novas (último ano), podendo ocorrer germinação de sementes de *E. crus-galli* em diferentes fases e ciclos de cultivo nas lavouras durante o ano. A ocorrência de elevada dormência em capim-arroz dificulta a realização de trabalhos a partir de sementes armazenadas por até dois meses.

2.4 CONCLUSÕES

A idade das sementes após a colheita afeta significativamente o nível de dormência e conseqüentemente a porcentagem e velocidade de germinação das mesmas, sendo que quanto menor o intervalo decorrido entre a colheita das sementes e a avaliação das mesmas, menor é a porcentagem de germinação destas.

Sementes avaliadas em períodos de um dia e dois meses após a colheita apresentam baixa porcentagem de germinação e IVG devido à

presença de dormência, a qual é superada naturalmente durante o período de armazenamento por um ou dois anos.

Sementes com um dia e dois meses após a colheita apresentam aumento da germinação quando expostas a 40 °C durante 7 dias.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Bethier, 350p, 2009.

ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. Plantas daninhas em arroz irrigado. **Arroz irrigado no sul do Brasil**, p. 457-546, 2004.

AZANIA, A. A. P. M. *et al.* Métodos de superação de dormência em sementes de *Ipomoea* e *Merremia*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 203-209, 2003.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C.C. The annual dormancy cycle in buried weed seeds: a continuum. **BioScience**, v. 35, n. 1, p. 492-498, 1985.

BODDY, L. G. *et al.* Stratification requirements for seed dormancy alleviation in a wetland weed. **PLoS One**, V. 8, n. 9, p. 1-11, 2013.

BODDY, L. G. **Growth, germination and dormancy of herbicide-resistant *Echinochloa phyllopogon*, and implications for management**. Davis: University of California, 2012. Dissertation (Doctor) - Office of Graduate Studies University of California, Davis, 2012.

DELATORRE, C.; Dormência em sementes de Arroz Vermelho. **Ciência Rural**, vol. 29, n.3, p. 565-571, 1999.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich) Stapf. pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 3, p. 145-151, 2008.

GUILLEMIN, J. P. *et al.* Assessing potential germination period of weeds with base temperatures and base water potentials. **Weed Research**, v. 53, n. 1, p. 76-87, 2013.

HALLETT, B. P.; BEWLEY, J. D. Membranes and seed dormancy: beyond the anaesthetic hypothesis. **Seed Science Research**, v. 12, n. 02, p. 69-82, 2002.

HEAP, I. **International survey of herbicide resistant weeds: lessons and limitations** Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. acesso em: 10 de junho de 2015.

HEYDECKER, W. (Ed). **Seed Ecology**. 1.ed. Norwich, England: Pennsylvania

State University, 1972. p. 23-249.

HOLM, L.G., *et al.* **The World's Worst Weeds: Distribution and Biology**. 1.ed. The University Press of Hawaii, Florida, 1991. 609p.

HONEK, A. *et al.* Annual cycles of germinability and differences between primary and secondary dormancy in buried seeds of *Echinochloa crus-galli*. **Weed Research**, v. 39, n. 1, p. 69-79, 1999.

HONEK, A.; MARTINKOVÁ, Z. Geographic variation in seed dormancy among populations of *Echinochloa crus-galli*. **Oecologia**, v.108, p.419-423, 1996.

JORDAN, J. L. *et al.* Effect of ultrafreezing to - 196°C on *Echinochloa crus-galli* seed coat, secretory epithelial structure and dormancy. **Phyton**, Argentina. n.43, p.9-19, 1983.

KETRING, A.L. Germination inhibitors. **Seed Science and Technology**, v.1, n.2 p.305-324.1973.

KISSMANN, K. G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF, Tomo I. 1997, 825p.

KOLLER, D. *et al.* Seed germination. **Plant Physiology**, v.13, p. 437-464, 1962.

KOVACH, D. A. *et al.* Variation in seed dormancy in *Echinochloa* and the development of a standard protocol for germination testing. II: Breaking dormancy in seeds unresponsive to light or dark conditions alone by using heat and ethanol pretreatment. **Seed Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 299-308, 2012.

LI, B.; FOLEY, M.E. Transcriptional and posttranscriptional regulation of dormancy-associated gene expression by afterripening in wild oat. **Plant Physiology**, v.110, n.1, p.1267-1273, 1996.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MAPA. **Regras para análise de sementes**.1.ed. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2009. 395p.

MARTINKOVÁ, Z. *et al.* Seed age and storage conditions influence germination of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Weed Science**, v.54, n. 2, p.298-304, 2006.

MARTINKOVÁ, Z.; HONĚK, A. Fatal Germination in Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Plant Protection Science**, v. 49, n. 4, p. 193-197, 2013.

MAUN, M. A. Response of seeds to dry heat. **Canadian Journal of Plant**

Science, 1977, n.57, p.305-307, 1977.

MENEZES, N. L. *et al.* Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de superação. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 7, n. 1, p. 35-44, 2009.

MIYOSHI, K.; SATO, T. The effects of kinetin and giberellin on the germination of dehusked seeds of Indica and Japonica rice (*Oryza sativa* L.) under anaerobic and aerobic conditions. **Annals of Botany**, London, n.80, p.479-483. 1997.

MOURSI, M. A., *et al.* Weed seed germination responses to some chemical treatments. **Journal Agronomy**. v.2, n.1, p.197-209, 1979.

OLATOYE, S. T.; HALL, M. A. Interaction of ethylene and light on dormant weed seeds. In: HEYDECKER, W. (Ed.). **Seed ecology**. University Park: Pennsylvania State University, p. 233-249, 1973

PARIZ, C. M. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de *Brachiaria* e avaliação da produtividade de massa seca, em diferentes sistemas de integração lavoura-pecuária sob irrigação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 330-340, 2010.

PONS, T. L. Induction of dark dormancy in seeds: its importance for the seed bank in the soil. **Functional Ecology**, v. 5, n. 5, p.: 669-675, 1991.

RAHN, E. M. *et al.* Life history studies as related to weed control in the Northeast.5.-Barnyardgrass. **Agric. Exp. Sta. Univ. Delaware Bull.** v.368, p.1-46. 1968.

RIZK, T. Y. *et al.* Effect of some promoters on weed seed germination. **Research Bulletin, Faculty of Agriculture, Ain Shams University**, n.818, p.30, 1978.

SAATKAMP, A. *et al.* Germination traits explain soil seed persistence across species: the case of Mediterranean annual plants in cereal fields. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 415-426, 2011.

SADEGHLOO, A. Seed germination and seedling emergence of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Planta daninha**, v. 31, n. 2, p. 259-266, 2013.

TAYLORSON, R.B. Anaesthetic enhancement of *Echinochloa crus-galli* L. Beauv. seed germination: possible membrane involvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 39, n. 1, p. 50-58, 1998.

VIEIRA, A.R. *et al.* Action of gibberelic acid (GA3) on dormancy and activity of α amylase in rice seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.2, p.43-48, 2002.

WATANABE, Y. Physiological and ecological studies in upland weeds in

Hokkaido. **Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station.** n.123, p.17-77, 1978.

YAMASUE, Y. *et al.* Physiological studies on seed dormancy of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* Beauv. var. *oryzicola* Ohwi). **Proc. 6th Asian-Pacific Weed Sci. Soc. Conf. Indonesia**.v. 31, n. 4,p.42-51, 1977.

Capítulo 3 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE FECUNDAÇÃO CRUZADA E PROLIFICIDADE EM CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crus-galli*)

RESUMO

Os problemas causados por capim-arroz tem aumentado devido a evolução de resistência aos herbicidas, a qual é dependente, dentre outros fatores, da taxa de fecundação cruzada e da produção e dispersão de sementes. Os objetivos deste trabalho foram identificar a taxa de fecundação cruzada e estimar a produção de sementes em *Echinochloa crus-galli*. A resistência aos herbicidas imidazolinonas foi utilizada como marcador para a quantificação da ocorrência de fecundação cruzada. Utilizou-se um biótipo resistente a herbicidas imidazolinonas (presença da mutação Trp574 no gene ALS) como planta doadora de pólen, e um biótipo suscetível como planta receptora. Na maturação, as sementes das plantas receptoras foram coletadas separadamente por planta em intervalos de 5 dias. Para identificação da taxa de fecundação cruzada avaliou-se 2.500 plantas para cada área experimental. As sementes das plantas receptoras obtidas a campo foram germinadas e transplantadas para caixas com solo. A seleção dos indivíduos foi realizada através da aplicação do herbicida imazethapyr. As avaliações foram realizadas ao final de 21 dias após a aplicação do herbicida, onde considerou-se plantas com alelos em heterozigose aquelas que sobreviveram à aplicação do herbicida. As plantas sobreviventes foram quantificadas em classes de acordo com seu vigor. A porcentagem de fecundação cruzada foi calculada dividindo-se o número de plântulas que sobreviveram a aplicação do herbicida, pelo total de plântulas avaliadas para cada amostra. A taxa de fluxo gênico média na espécie de capim-arroz *E. crus-galli* foi de 3,46%, variando de 2,96% a 4,41%. Na avaliação de vigor 24,28%, 30,92% e 44,80% das plantas foram classificadas nas escalas 1, 2 e 3 respectivamente. Estes resultados demonstram grande variação de crescimento das plantas sobreviventes. A produção de sementes de *E. crus-galli* pode chegar a 23.107 sementes por planta, quando cultivadas em condições de campo a uma densidade de 1 planta/m². O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) mesmo sendo considerada uma planta autógama, apresenta elevada taxa de fecundação cruzada. A taxa de fecundação cruzada encontrada está relacionada com a rápida evolução da resistência a herbicidas imidazolinonas ocorrida na região sul do Brasil.

EVALUATION OF OUT-CROSSING RATE AND SEED PRODUCTION IN BARNYARDGRASS (*Echinochloa crus-galli*)

ABSTRACT

The problems caused by barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) has increased due to evolution of herbicide resistance, which is dependent, among other factors, of the mating system and seed dispersion. The objectives of this study were to evaluate the outcrossing rate and to estimate the seed production of barnyardgrass. The resistance to imidazolinone herbicides was used as a marker for quantifying the occurrence of cross-fertilization. A imidazolinone-herbicide resistant biotype (ALS gene mutation Trp574) as pollen donor plant and a susceptible biotype as pollen receptor. Seeds from the receptor plants were harvest at maturity separately per plant at intervals of 5 days. The outcrossing rate identification was based on the evaluation of 2,500 plants per experimental area. Seeds were germinated and transplanted into boxes with soil. The identification of resistant individuals was performed by applying the herbicide imazethapyr in plants with three to four leaves. The evaluations were performed at 21 days after herbicide application, where it was considered plants with heterozygous alleles those who survive the herbicide application. Survival was classified in three classes according with plant size. The out-crossing rate was calculated based on the number of survived plants in relation to the total number of evaluated plants. The average out-crossing rate in barnyardgrass was 3.46%, ranging from 2.96% to 4.41%, depending on the evaluated area. In evaluating existing 24.28%, 30.92% and 44.80% of the plants were classified in ranges 1, 2 and 3 respectively. These results show wide variation in growth of surviving plants. The production of *E. crus-galli* seeds can reach 23.107 seeds per plant when grown under field conditions at a plant density of 1 / m². The barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) even being considered an autogamous plant, it has a high outcrossing rate. The outcrossing rate found is related to the rapid evolution of resistance to imidazolinone herbicides occurred in Southern Brazil.

3.1 INTRODUÇÃO

Diversas plantas daninhas ocorrem na cultura do arroz-irrigado, sendo que o capim-arroz (*Echinochloa* spp.) é considerado um dos principais grupos de espécies, devido ao alto efeito de competição com a cultura. De forma geral, infestações de 40 plantas por m⁻² de *Echinochloa* spp. reduzem o rendimento dos grãos de 50 a 70% (Carey, 1990; Fischer *et al.*, 1997) e apenas uma planta de capim-arroz reduz o rendimento de grãos entre 8,4 e 11,3% (Agostinetto *et al.*, 2007). Ainda, os problemas causados pelo capim-arroz têm aumentado devido à ocorrência de resistência a herbicidas no Brasil e em diversas regiões do mundo.

Os mecanismos que conferem resistência a herbicidas podem ser classificados em dois tipos: resistência relacionada ao local de ação (RLA) e não relacionada ao local de ação (NRLA). Na resistência RLA, ocorre mutação ou super-expressão do gene que codifica a enzima alvo do herbicida, tornando-a menos sensível ao herbicida. A ocorrência de mutação no gene codificante da enzima alvo é o processo mais comum, o qual em geral é determinado por um alelo dominante em um único loco gênico com localização cromossômica nuclear, com exceção para a resistência a atrazina (cloroplastos) (Delye *et al.*, 2013). Na resistência NRLA os mecanismos envolvidos reduzem a quantidade final de herbicida que chega ao local de ação, através de redução da taxa de absorção, translocação ou aumento das taxas de metabolização da molécula herbicida e sequestro no vacúolo (Yu & Powles, 2014).

A resistência NRLA geralmente é governada por vários genes (poligênica) e pode conferir resistência a diferentes modos de ação de herbicidas. Já a resistência conferida por um único gene possui maior probabilidade de distribuir-se dentro de uma população mais rapidamente em comparação com a resistência poligênica (Preston, 2003). Em especial em

espécies de auto-polinização, os alelos de resistência podem dispersar-se rapidamente, já que a autofecundação aumenta a frequência de indivíduos homocigotos. Um alelo dominante também possui maior probabilidade e velocidade de disseminação quando comparado a um alelo recessivo, pois um alelo dominante é expresso no homocigoto e ainda nos estados heterocigotos, sendo que a seleção através da aplicação de herbicidas elimina continuamente os alelos recessivos da população (Jasieniuk *et al.*, 1996; Charlesworth, 1992).

A proteína alvo da maior parte dos herbicidas é codificada por um gene nuclear e as mutações nesses genes podem ser herdadas tanto por gametas masculinos quanto femininos. Nestes casos, o enriquecimento de alelos resistentes na população pode ocorrer de forma rápida e o fluxo de genes resistentes (dispersão) é mais rápido quando comparado à resistência controlada por um gene citoplasmático (Mithila & Godar, 2013).

As características genéticas da herança e consequente evolução da resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS, apresentam grande importância para o entendimento deste problema e para a definição de estratégias de manejo da mesma. Alelos resistentes por mutação no gene ALS são selecionados mesmo quando presentes na condição heterocigótica, pois mesmo apresentando funções em plastídios, a ALS é um gene nuclear e segue os padrões de herança mendeliana normal. A mutação no gene ALS que confere resistência a estes herbicidas é, portanto, transmitida tanto via pólen como por sementes (Wright & Penner 1998; Tranel & Wright, 2002). Estas características podem explicar parcialmente a alta frequência de ocorrência de resistência aos inibidores de ALS em relação a alguns outros herbicidas, além de que, em trabalhos de estimativas das taxas de cruzamento em plantas daninhas, a própria característica de resistência pode fornecer um marcador fenotípico apropriado para este tipo de avaliação (Merotto Jr. *et al.*, 2009).

A ocorrência de variações genéticas capazes de ser transmitidas hereditariamente e a seleção natural favorecem a evolução da resistência aos herbicidas. Aplicações sucessivas de herbicidas, em uma população de plantas provocam seleção direcional e progressiva de indivíduos que possuem genes de resistência, tornando-os predominantes na área (Kissmann, 1996). A frequente utilização de herbicidas imidazolinas em arroz Clearfield resultou na seleção de biótipos resistentes preexistentes que, devido à pressão de seleção

exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida, encontra condições para multiplicação, tornando-se predominantes, devido à eliminação das plantas sensíveis. Em avaliação de *Echinochloa crus-galli* coletada na região Sul do Brasil foi encontrado que 81% das 624 populações analisadas foram resistentes a herbicidas imidazolinonas (Matzembacher *et al.*, 2014). Esta evolução da resistência ocorreu após três a quatro anos da utilização de herbicidas imidazolinonas associadas ao uso de cultivares resistentes a estes herbicidas em aproximadamente 500.000 ha⁻¹ de arroz irrigado no Sul do Brasil, indicando a rápida evolução da resistência nestas regiões (Matzembacher *et al.*, 2014).

A evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas de um modo geral é dependente de vários fatores, sendo que os fatores genéticos são de grande importância. Os principais fatores genéticos são: o número de alelos envolvidos na expressão da resistência, a frequência do(s) alelo(s) de resistência na população inicialmente sensível, o modo de herança da resistência (citoplasmática ou nuclear), as características reprodutivas da espécie, a pressão de seleção e a taxa de cruzamentos (Mortimer, 1998). Características relacionadas ao aparato reprodutivo, como sistema de fecundação das espécies apresentam relevância na dispersão do alelo de resistência para plantas daninhas suscetíveis. Em plantas cuja reprodução é predominantemente sexuada, a dispersão de grãos de pólen durante a fase reprodutiva possui grande relevância na evolução da resistência aos herbicidas (Latta *et al.*, 1998). Neste sentido, o fluxo de genes de resistência mediados por pólen possui grande influência nas variações genéticas dentro de uma população, na frequência de resistência múltipla ou poligênica a herbicidas, e nas dinâmicas evolutivas de uma espécie (Smith *et al.*, 2015).

Apesar de possuir grande importância para o entendimento da dinâmica populacional de plantas daninhas e da evolução da resistência aos herbicidas, o sistema de fecundação das principais plantas daninhas é pouco conhecido de forma geral, e principalmente em relação as particularidades de populações de determinadas regiões. A taxa de fecundação cruzada tem sido estudada em condições controladas e de campo, sobretudo envolvendo cultivares resistentes e suscetíveis a herbicidas. Dentre as inúmeras espécies estudadas, a cultura do arroz está entre as principais, onde foram realizados diversos

estudos sobre fluxo gênico para com biótipos de arroz-vermelho (*Oriza sativa* L.) (Gealy *et al.*, 2003; Shivrain *et al.*, 2009; Goulart, 2011).

A informação sobre a taxa de fecundação cruzada em capim-arroz nas condições do sul do Brasil não é existente. Esta informação é importante, pois a quantificação do fluxo gênico pode permitir estimativas sobre a facilidade de dispersão da resistência quando originada por mutação no local de ação e sobre a possibilidade de piramidização de genes de pequeno efeito relacionados ao incremento da metabolização do herbicida. A comparação da importância da ocorrência de fluxo do gene de resistência permite a realização de previsões da evolução e da distribuição da resistência aos herbicidas, assim como a melhor determinação de procedimentos relacionados a prevenção e controle deste problema (Smith *et al.*, 2015). A existência de plantas de capim-arroz com resistência a herbicidas devido a ocorrência de mutação no gene ALS pode ser utilizada como sistema de quantificação da fecundação cruzada nesta espécie (Alibert *et al.*, 2005; Bagavathiannan & Norsworthy, 2014). Desta forma, o sistema caracterizado pela resistência a herbicidas causado por mutação no gene ALS também pode ser empregado para quantificação da hibridização interespecífica.

A produção de sementes de plantas daninhas e em específico do capim-arroz também representa um fator de extrema relevância na determinação da dinâmica populacional de plantas daninhas a longo prazo, sendo que programas de manejo que se concentram apenas em um ciclo de cultivo (uma safra) provavelmente serão ineficazes (Davis *et al.*, 2003; Gallandt, 2006). Além disso, o aumento da disseminação de resistência a herbicidas por meio de sementes em populações de plantas daninhas possui grande influência na evolução e dispersão da resistência, merecendo assim uma maior atenção na limitação da produção de sementes de plantas daninhas e no tamanho do banco de sementes. A prolificidade de *Echinochloa crus-galli* possui alta plasticidade, sendo dependente e responsiva às condições do ambiente e densidade de plantas (Maun e Barrett, 1986). Em média, uma planta de *Echinochloa crus-galli* apresentando bom desenvolvimento e com baixa competição, produz cerca de 7.160 sementes/planta. No entanto, observam-se variações na produção de sementes de *E. crus-galli*, podendo ocorrer produções de 40.000 até 1.000.000 de sementes por planta (Duke, 1983;

Mitich, 1990). Em função de inúmeros fatores, principalmente relacionados a características ambientais e intrínsecas da biologia do capim-arroz, existe a necessidade do conhecimento do potencial de produção de sementes desta planta daninha para as condições edafoclimáticas da região Sul de cultivo de arroz-irrigado do Brasil. Os objetivos deste trabalho foram identificar a taxa de fecundação cruzada e estimar a produção de sementes em capim-arroz (*E. crus-galli*).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado a campo na Estação Experimental da Empresa Oryza & Soy localizada em Palmares do Sul, RS. O solo é classificado como Gleissolo Háplico Ta distrófico típico e clima subtropical úmido conforme classificação de Koeppen. Experimentos também foram conduzidos em casa-de-vegetação onde as sementes obtidas foram avaliadas em relação a ocorrência de fecundação cruzada.

3.2.1 Material vegetal

A resistência aos herbicidas do grupo químico imidazolinonas foi utilizada como marcador para a quantificação da ocorrência de fecundação cruzada em *E. crus-galli*. Foram utilizados dois biótipos, sendo um resistente a herbicidas imidazolininas (MOSTS-51), previamente caracterizado por Bortoly (2013) onde foi constatada a ocorrência da mutação Trp574 no gene ALS, e outro biótipo suscetível a estes herbicidas (MOSTS-01). Estes biótipos são originários do Município de Mostardas do Sul, RS. A população suscetível foi utilizada como receptora e a resistente como doadora de pólen.

Inicialmente foi realizada a avaliação da homozigose dos biótipos parentais resistente e suscetível através do método adaptado de Vargas *et al.* (2001), onde semeou-se de uma panícula autofecundada 50 sementes, em uma bandeja contendo 5 Kg de solo. Quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas aplicou-se o herbicida imazethapyr (Pivot, 106 g/L CS, BASF S.A.) na dose de 106 g ha⁻¹ + 0,5% v/v de Dash. A identificação da morte de pelo

menos uma planta indica a ocorrência de segregação e a necessidade de descarte da população. Caso não ocorra a morte de nenhuma planta, a população então é considerada homocigota dominante resistente ao herbicida, estando assim apta para ser utilizada no experimento a campo. Por outro lado, a população é considerada homocigota suscetível, quando todas as plantas morreram após o tratamento com o herbicida. Após estas avaliações prévias, as populações homocigotas resistentes (RR) e homocigotas suscetíveis (rr) foram utilizadas como doadores e receptores de pólen, respectivamente.

As sementes foram germinadas em placas de Petri com papel germinador e mantidas em câmara de germinação em temperatura de 25°C. Após a germinação, as plantas foram transplantadas em recipientes plásticos com capacidade para 250 mL preenchidos com solo corrigido, seguindo recomendações de adubação e calagem para a cultura do arroz (ROLAS, 2004). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação sendo que a adubação e os demais tratamentos culturais seguiram as recomendações técnicas da pesquisa para a cultura do arroz-irrigado na região Sul do Brasil (SOSBAI, 2012). Uma semana após o transplante, foi realizado desbaste mantendo-se uma planta por vaso. As plantas foram mantidas com irrigação por inundação mantendo-se o nível de água de dois a três centímetros acima do nível do solo.

3.2.2 Implantação e estabelecimento do experimento

As plantas foram transplantadas para o campo quando estas se encontravam no início da fase de perfilhamento. O transplante ocorreu no dia 17 de fevereiro de 2014. O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados sendo que o tratamento constituiu-se de quatro áreas distintas. Em cada área foram transplantadas 20 plantas doadoras de pólen (resistentes) e 12 plantas receptoras de pólen (suscetíveis), sendo que cada planta receptora constituiu uma repetição, conforme ilustrado na Figura 3.1. As quatro áreas contendo o conjunto de plantas foram dispostas a uma distância de dez metros entre si.

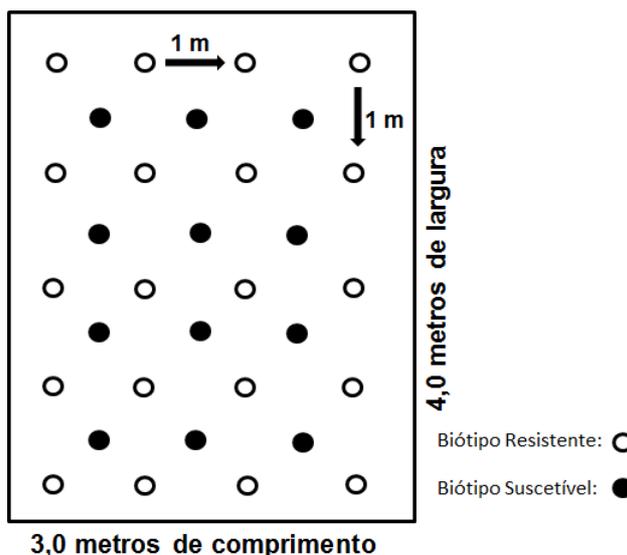


FIGURA 3.1. Esquema ilustrativo de cada área no experimento a campo relacionado a avaliação da taxa de fecundação em capim-arroz.

Após o início da maturação fisiológica as sementes das plantas receptoras de pólen (suscetíveis) foram coletadas separadamente por planta dentro de cada área, em intervalos de cinco dias devido a maturação desuniforme das sementes dentro da panícula de capim-arroz. Após a colheita, as sementes foram colocadas à sombra para secar e armazenadas em sacos de papel a 10 °C.

O número total de sementes coletadas por planta ao final do experimento foi utilizado para estimativa da quantidade total de sementes produzidas por planta de capim-arroz da espécie *E. crus-galli*. Esta estimativa foi realizada por meio da pesagem de quatro repetições de 200 sementes para cada planta da qual foi coletada sementes (12 plantas por área). Após realizou-se pesagem do total de sementes coletado por planta e através do valor obtido da média das repetições estimou-se o número total de sementes produzido por planta.

3.2.3 Identificação das progênies resistentes

A determinação do número de sementes “n” a serem avaliadas na detecção de híbridos no ensaio de fecundação cruzada, foi realizada conforme proposto por Jhala *et al.* (2011) (Tabela 3.1).

TABELA 3.1 Tamanho da amostra em número de sementes, em função de três níveis de confiança (α) e três níveis de poder do teste.

Frequência de fluxo gênico	Confiança (α)								
	$\alpha=5\%$	$\alpha=2,5\%$	$\alpha=1\%$	$\alpha=5\%$	$\alpha=2,5\%$	$\alpha=1\%$	$\alpha=5\%$	$\alpha=2,5\%$	$\alpha=1\%$
	Poder=0,80			Poder=0,85			Poder=0,95		
0,01	1989	2588	3383	2242	2875	3710	3128	3869	4829
0,005	3996	5199	6767	4503	5776	7454	6282	7771	9700
0,0025	8010	10422	13625	9026	11577	14941	12590	15573	19441
0,001	20052	26090	34109	22595	28980	37402	31513	38982	48664
0,0005	40122	52204	62248	45209	57985	74837	63051	77995	97368

¹Adaptado de Jhala *et al.*, 2011.

Onde “n” é o tamanho da amostra requerida em número de sementes o qual aumenta com a diminuição da frequência de fluxo gênico. A frequência de fluxo gênico, por sua vez, diminui com o aumento da distância entre a planta doadora de pólen e a receptora (Goulart, 2011). No entanto diversos estudos têm demonstrado que distâncias de 0,3 a 3,5 metros apresentam uma frequência de fluxo gênico de 0,01 em plantas de arroz (Messeguer *et al.* 2001; Chen *et al.*, 2004; Shivrain *et al.*, 2009). Deve-se enfatizar que os parâmetros citados acima foram baseados em estudos sobre a cultura do arroz, sendo que no momento da condução do experimento não havia estudos similares direcionados à cultura do capim-arroz. Neste caso, foram considerados os seguintes parâmetros para a determinação do tamanho da amostra: frequência de fluxo gênico de 0,01, poder de 0,85 e 5% de nível de confiança que resulta na necessidade de avaliação de 2.242 sementes. A partir do número “n” e de um fator de segurança de 10% (viabilidade das sementes) considerou-se a necessidade de avaliação de 2.500 plantas como tamanho de amostra para cada unidade experimental.

O início das avaliações com as sementes das plantas receptoras obtidas a campo foi realizado através da germinação em placas de Petri com papel germinador e incubadas em câmara a uma temperatura de 25°C. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para caixas de plástico contendo solo Gleissolo Háplico Ta distrófico típico, onde permaneceram em casa de vegetação até apresentarem 3-4 folhas verdadeiras. Utilizou-se 50 bandejas por tratamento, com 50 plantas por bandeja.

A identificação dos indivíduos com a característica de resistência, que indica a ocorrência de migração do gene de resistência e, em conjunto possibilita a determinação da taxa de fecundação cruzada, foi realizada através da aplicação do herbicida imazethapyr na dose de 106 g ha^{-1} quando estas encontravam-se com 3-4 folhas verdadeiras. A aplicação foi realizada em câmara de aplicação pressurizada com CO_2 , com bico “E” 110,02 mantido à pressão constante de 200 kPa e calibrado para vazão de 200 L/ha^{-1} . As avaliações foram realizadas ao final de 21 dias após a aplicação (DAT), onde foram consideradas plântulas com loco gênico em heterozigose, aquelas que sobreviverem à aplicação do herbicida. Além disto, as plantas sobreviventes foram quantificadas em classes através de avaliações visuais de acordo com suas características de vigor ao final de 21 DAT (Tabela 2 e Figura 2).

TABELA 3.2. Classificação das plantas sobreviventes em função do vigor. Porto Alegre, 2015.

Classificação	Características das plantas
Classe 1	Plantas normais
Classe 2	Plantas normais de crescimento reduzido
Classe 3	Plantas anormais de crescimento reduzido

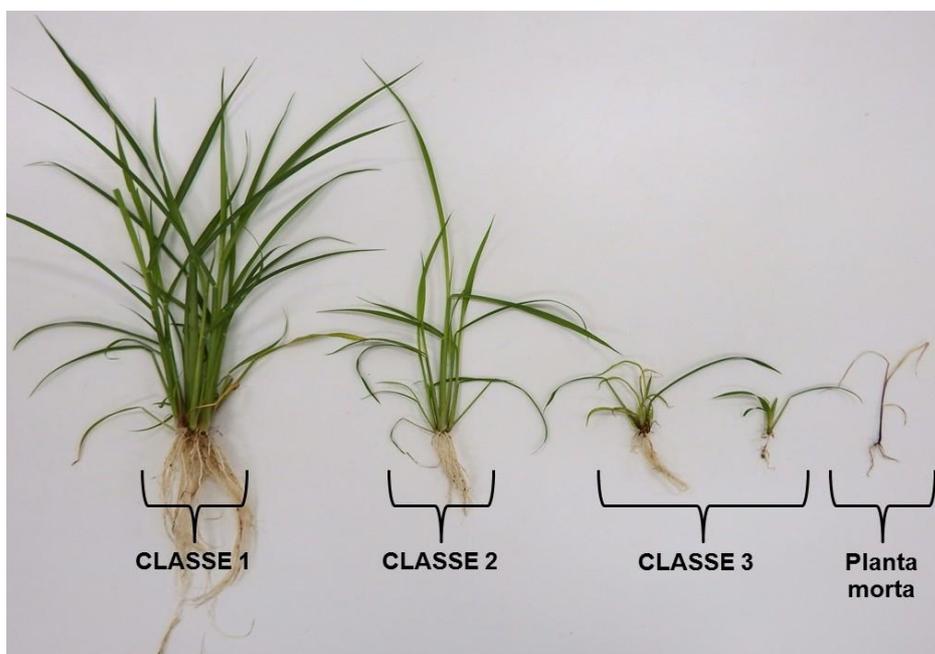


FIGURA 3.2. Ilustração das diferenças de crescimento das plantas sobreviventes e não sobreviventes aos 21 dias após a aplicação do herbicida imazethapyr.

A avaliação da taxa de fecundação cruzada foi determinada calculando-se o número de sementes com loco gênico em heterozigose (Rr) em relação ao número total de sementes examinadas em cada planta. Esta metodologia foi utilizada por Alibert *et al.* (2005) para avaliação de fluxo gênico em beterraba açucareira, e parte do pressuposto de que o gene utilizado como marcador possui origem nuclear e dominante. Desta forma, o alelo será passado via pólen para o embrião e posteriormente para a semente, conferindo ao indivíduo o caráter de resistência ao mesmo herbicida o qual o gene atua.

A porcentagem de fecundação cruzada foi calculada dividindo-se o número de plântulas que sobreviveram a aplicação do herbicida, pelo total de plântulas avaliadas para cada amostra. O resultado encontrado foi comparado com a frequência de mutações espontâneas através do teste *t*, pois este processo também pode resultar na ocorrência de resistência ao herbicida utilizado. Os dados foram submetidos a análise de normalidade e após à análise de variância, seguido pela complementação através de teste Tukey a 5 % de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Taxa de fecundação cruzada

A avaliação da taxa de fecundação cruzada em capim-arroz da espécie *E. crus-galli* resultou das sementes obtidas das plantas receptoras de pólen (suscetível ao herbicida imazethapyr) tratadas com o herbicida imazethapyr. A Figura 3.3 apresenta as plantas sobreviventes que contém o gene que codifica a enzima ALS resistente devido à mutação Trp574, advindo das plantas doadoras resistentes ao herbicida. Observações regulares das plantas a campo confirmaram a presença de sincronismo floral em todo o período de condução do experimento, reduzindo assim, a possibilidade de erros no momento das avaliações das progênes. Em um total de 10.000 plantas avaliadas nas quatro áreas em que o experimento foi conduzido, foram encontradas 346 plantas resistentes, o que resultou em uma taxa média de fluxo gênico de 3,46% (Tabela 3.3).



FIGURA 3.3. Ilustração das plantas sobreviventes (setas pretas) e não sobreviventes (seta vermelha) aos 21 dias após a aplicação do herbicida imazethapyr.

TABELA 3.3. Taxa de fecundação cruzada em capim-arroz obtida através da migração do gene ALS de resistência ao herbicida imazethapyr. Palmares do Sul, RS, 2015.

Área	Total de plantas avaliadas	Nº de plantas sobreviventes	% de plantas sobreviventes
A	2.500	78	3,11b*
B	2.500	74	3,37ab
C	2.500	128	4,41a
D	2.500	66	2,96b
MÉDIA GERAL	10.000	346	3,46A**
Taxa de mutação espontânea (1×10^{-6})			0,000001B
CV (%)			14.12

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, segundo o Teste t a 1% de probabilidade.

A taxa de fecundação cruzada intraespecífica variou significativamente entre as quatro áreas avaliadas, sendo que na média das doze plantas avaliadas, a área C apresentou 4,41% de fecundação cruzada, sendo este o maior valor observado, diferindo estatisticamente em 5% de probabilidade das áreas A e D, que apresentaram as menores taxas de fecundação cruzada (3,11% e 2,96%) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados também para *E. crus-galli* onde detectou-se 3,22% (2010) e 4,47% (2011) de fluxo gênico quando as plantas encontravam-se a uma distância de 0,5 m entre si, diminuindo exponencialmente a distâncias maiores (0,01% a 50m)

(Bagavathiannan & Norsworthy, 2014). Em contrapartida, tem sido demonstrado o fluxo gênico mediado por pólen entre populações de *Lolium rigidum* resistentes a herbicida e populações suscetíveis em distâncias de até 3 km (Busi *et al.*, 2008). No entanto, a característica de fecundação cruzada obrigatória em *L. rigidum* está relacionada com a ocorrência de fluxo gênico através da migração a grandes distâncias.

Observa-se também certo grau de variação na porcentagem final de fecundação cruzada entre as diferentes áreas do experimento, variando de 2,44 a 4,84%. Sabe-se que o fluxo gênico (via pólen) é um processo que depende de vários fatores, como: sincronismo floral, elevada compatibilidade, abundância de vetores e métodos de difusão de pólen, distância de movimentação do pólen, condições ambientais apropriadas para polinização cruzada e o tempo em que os grãos de pólen podem permanecer viáveis no ambiente (Carpenter *et al.*, 2002; Sosnoskie *et al.*, 2009). Estes fatores podem explicar as variações observadas entre as diferentes áreas conforme descrito acima. Isto demonstra que apesar de a porcentagem de fecundação cruzada média observada em capim-arroz ser de 3,46%, estes valores podem ser ainda maiores do que os observados no presente estudo, quando considerou-se plantas individuais, principalmente em maior densidade de infestação.

Variações relacionadas a morfologia floral, como densidade e tamanho das flores, presença ou não de aristas (barreira física), nível de exposição dos estigmas no exterior das flores, dentre outras, poderiam influenciar na taxa de fecundação cruzada. Variações estas detectadas por Altop & Mennan (2011) e Bortoly (2013), que avaliando variações morfológicas e genéticas em diversos biótipos da espécie *E. crus-galli*, mostram alta variabilidade genética, assim como de órgãos vegetativos e reprodutivos entre os genótipos individuais da mesma espécie. Taxas variadas de fecundação cruzada dentro de biótipos da mesma espécie também foram observadas em plantas de arroz, oscilando de 0,01 a 52%, dependendo das condições ambientais e de cultivo, das características inerentes aos biótipos, da época de florescimento e da distância entre plantas (Langevin *et al.*, 1990; Gealy *et al.*, 2003; Shivrain *et al.*, 2009).

Através dos resultados observados, pode-se inferir que a utilização de plantas contendo o gene de resistência como indicador da transferência de pólen foi eficiente para avaliação da taxa de fecundação cruzada em capim-

arroz. A utilização de plantas polinizadoras contendo um gene de tolerância a herbicida, em experimentos para estimar o fluxo gênico, tem a vantagem de permitir que toda a produção de sementes das plantas receptoras possa ser avaliada e facilita a identificação de indivíduos resultantes de fecundação cruzada (Messeguer *et al.*, 2004). Avaliação da taxa de fecundação cruzada também pode ser realizada através de marcadores moleculares (Merotto Jr. *et al.*, 2009). No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, como o grau de polimorfismo pressuposto, a disponibilidade de *primers* para a espécie em avaliação, e especificidade de reagentes e equipamentos (Spooner *et al.*, 2005).

A taxa média de fecundação cruzada encontrada foi significativamente superior a taxa de mutação espontânea do gene ALS (1×10^{-6}) (Tabela 3.1). A questão-chave do manejo nestas condições, é se os alelos de resistência irão migrar para populações de plantas daninhas sensíveis a uma taxa maior do que surgem através de novas mutações. A resposta a esta pergunta possui implicações importantes no manejo da resistência a herbicidas, pois se a frequência de mutação *in situ* em uma população excede a velocidade à qual os alelos de resistência migram entre populações, então a dinâmica de evolução da resistência será ditada principalmente de acordo com o manejo no nível do campo. Por outro lado, quando a migração é oriunda a partir de populações vizinhas resistentes exceder as taxas de mutação natural, então a evolução da resistência será ditada pelas práticas de manejo da região (Neve *et al.*, 2014).

3.3.2 Vigor das plantas sobreviventes

A avaliação das plantas sobreviventes quanto ao vigor aos 21 dias após a aplicação do herbicida imazethapyr. Esta avaliação foi realizada com base em três classes visuais (Tabela 3.2). Foram observadas variações morfológicas resultantes da aplicação do agente selecionador dentre as 346 plantas sobreviventes. Em relação as diferenças de vigor observadas nas plantas sobreviventes, foram encontradas desde plantas apresentando desenvolvimento normal, sendo classificadas como pertencendo a classe 1, até

plantas de tamanho extremamente reduzido e apresentando desenvolvimento estrutural anormal (Classe 3) (Figura 3.2).

As plantas da classe 1 apresentavam desenvolvimento superior as demais, elevado número de afilhos secundários e terciários, sendo que as mesmas totalizaram 24,28% (84 plantas) do total de plantas sobreviventes (Tabela 3.4). As plantas da classe 2 constituíram 30,92% (107 plantas) do total de plantas avaliadas, apresentando ausência de deformações morfológicas porém com desenvolvimento reduzido, mostrando-se inferior quando comparadas às plantas da classe 1 e superior quando comparadas às plantas da classe 2.

TABELA 3.4. Número de plantas sobreviventes a aplicação de imazethapyr em função das classes de vigor. Palmares do Sul, RS, 2015.

Classificação	Média
CLASSE 1	84 b*
CLASSE 2	107 ab
CLASSE 3	155 a
CV (%)	21.36

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O maior número de indivíduos sobreviventes à aplicação do herbicida foi de plantas pertencentes a classe 3, com 44,80% (155 plantas) de todas as plantas sobreviventes avaliadas (Tabela 3.4). Estes indivíduos apresentavam características morfológicas e de vigor distintas das demais citadas anteriormente, apresentando crescimento reduzido quando comparada com as plantas das classes anteriores, assim como crescimento assimétrico e deformações morfológicas (Figura 3.2).

As variações observadas nos fenótipos das plantas sobreviventes podem ser decorrentes de inúmeros fatores, como variabilidade genética relacionada a genes de detoxificação, absorção e translocação diferenciadas e variação da atividade da enzima ALS, ou ainda fatores relacionados a variação ambiental, como diferente quantidade interceptada do herbicida entre as plantas.

O fluxo gênico proporciona a dispersão dos genes de resistência, acarretando no surgimento de novos indivíduos resistentes quando regulada

por um único gene. No entanto, também pode ser responsável pelo aumento do nível de resistência, através da piramidização de genes menores (Chauvel & Gasquez, 1994).

No caso da resistência mediada por enzimas do citocromo P450, a resistência é de origem poligênica, sendo que avaliações através de uma única dose do herbicida tornam-se mais complexas, pois os indivíduos desta população são geneticamente variáveis, podendo, após o fluxo gênico, observar-se a presença de genes de resistência piramidizados. Em situações onde a variação fenotípica é sustentada por variação genética aditiva, a recombinação dessa variação através de fluxo gênico, por exemplo, pode levar a um rápido e variável aumento na resistência (Preston, 2003).

Grande número de genes relacionados a enzimas do citocromo P450 associados a detoxificação de xenobióticos foram identificados em plantas (Yuan *et al.*, 2007; Mizutani & Ohta, 2010). Estes genes, responsáveis por conferir baixos níveis de resistência, quando avaliados em plantas F₁ oriundas de cruzamentos entre biótipos resistentes e suscetíveis a diclofop, mostraram-se em heterozigose, em função de valores de segregação da resistência, tornando variável a resposta destas plantas a uma mesma dose de herbicida (Busi *et al.*, 2011). Possivelmente este estado de heterozigose ligado aos genes relacionados com a metabolização do herbicida pode ter proporcionado variações no crescimento das plantas sobreviventes, apresentando diferentes graus de sensibilidade a uma mesma dose de herbicida aplicado no presente estudo.

Existem também proporções da variação fenotípica causada pelos efeitos dos fatores ambientais na determinação do fenótipo dos indivíduos da população, como por exemplo, a deposição diferencial de gotas sobre a superfície das plantas no momento da aplicação. Como consequência destas variações de vigor observadas nas plantas sobreviventes à aplicação do herbicida, o desenvolvimento reduzido das plantas pertencentes a classe 3 poderia constituir em uma penalidade evolutiva, visto que em seu desenvolvimento inicial estas plantas seriam menos competitivas pela busca de recursos do meio (luz, água e nutrientes) quando comparadas as demais plantas de desenvolvimento normal presentes no mesmo nicho ecológico a nível de campo.

3.3.3 Prolifidade do capim-arroz

A produção de sementes também representa uma relevante estratégia do capim-arroz para perpetuação da espécie e simultaneamente com o fluxo de pólen, constitui uma das mais importantes estratégias de dispersão da resistência a herbicidas. No presente estudo, as plantas de *E. crus-galli* foram cultivadas em condições de campo a uma densidade de 1 planta/m², sendo que a produção de sementes por planta variou de 20.251 até 23.107 sementes (Tabela 3.5). A produção de sementes da espécie *E. crus-galli* é variável, dependendo principalmente das condições de cultivo, densidade das plantas e condições do meio, sendo que em estudo realizado a campo no Sul dos Estados Unidos foi encontrada produção de sementes variando de 2.900 a 39.000 sementes por planta (Bagavathiannan *et al.*, 2011). No entanto, quando em condições ideais de crescimento obteve-se produções de até um milhão de sementes por planta (Mitich, 1990).

TABELA 3.5. Produção de sementes de *Echinochloa crus-galli* em condições de campo. Palmares do Sul, 2015.

Áreas	Nº médio de sementes/planta
A	20.251b*
B	20.927ab
C	21.060ab
D	23.107a
MÉDIA GERAL	21.336
CV (%) 10,52

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A alta produção de sementes observada pode ser devido à ausência de competição interespecífica, principalmente com a cultura do arroz-irrigado, a qual em condições normais de cultivo apresenta altas densidades de plantas por m⁻² e assim alta competição por nutrientes e luz. Por exemplo, condições de sombreamento podem causar reduções significativas na produção de sementes de *Echinochloa* sp., chegando a 77%, 83% e 92% de redução na produção de sementes em *E. crus-galli*, *E. glabrescens* e *E. colona*, respectivamente (Chauhan, 2013). No presente estudo, as condições de manejo adotadas foram as mesmas utilizadas na condução de uma lavoura de arroz comercial, sendo que o manejo da água e de fertilizantes também

possuem influência sobre o crescimento e produção de sementes de capim-arroz. Em condições onde as plantas de *E. colona* foram submetidas a limitações hídricas por exemplo, houve redução de 52% na produção de sementes das plantas (Chauhan & Johnson, 2010).

3.3.4 Implicações no manejo e dispersão da resistência

Os resultados obtidos indicam a ocorrência de taxa de fecundação cruzada média de 3,46% em *E. crus-galli* nas condições de cultivo de arroz irrigado no Sul do Brasil. As estratégias de prevenção e manejo da resistência a herbicidas em capim-arroz da espécie *E. crus-galli* devem ser visualizadas diferentemente de como seria se a espécie apresentasse características de 100% de autogamia, pois a taxa de fecundação cruzada entre os biótipos resistentes e suscetíveis determina a dispersão dos alelos de resistência na população. A taxa de fecundação cruzada encontrada pode estar relacionada com a rápida evolução da resistência a herbicidas imidazolinonas ocorrida na região Sul do Brasil causada por mutação no gene ALS, e indica facilidade de distribuição da resistência múltipla causada pela piramidização de genes de pequeno efeito já observadas em algumas populações.

A taxa de fecundação cruzada e a produção de sementes de capim-arroz possuem grande importância e influência no aumento da frequência de indivíduos resistentes em áreas agrícolas. Por exemplo, através dos dados obtidos, pode-se estimar o número de plantas daninhas resistentes em uma determinada lavoura. Uma área agrícola com a presença de apenas uma planta de capim-arroz originada por evolução natural ou migração contendo resistência a herbicidas devido a presença de um gene nuclear dominante, já no primeiro ano de desenvolvimento poderia produzir mais de 23 mil plantas resistentes oriundas de suas sementes, de acordo com os resultados do presente estudo. Além disso, caso ocorra fluxo gênico para 50 plantas suscetíveis, presentes no entorno da mesma, através da taxa de fecundação cruzada de 3,46% e uma quantidade de sementes produzidas por planta de até 23.000, poder-se-ia observar o surgimento de 39.790 plantas contendo o gene de resistência oriundo de fluxo gênico apenas no primeiro ano.

Mesmo com as frequências de fluxo gênico observadas sendo relativamente baixas, pode se ter consequências evolutivas significativas, pois os níveis de fluxo de genes detectados no presente estudo são tipicamente maiores do que a frequência inicial esperada de um determinado alelo de resistência a herbicida em uma população de plantas daninhas naturais antes da seleção (1×10^{-6}), resultando em um aumento exponencial do número de plantas resistentes dentro de uma população. Além das práticas usualmente utilizadas para o controle destas plantas, cabe enfatizar a possível necessidade de utilização de práticas de manejo auxiliares, como controle mais rigoroso em áreas em que sabidamente há presença de plantas de *E. crus-galli* resistentes, objetivando a eliminação das plantas antes do início da floração, tentando reduzir ao máximo a possibilidade de cruzamentos e dispersão de sementes e conseqüentemente aumento do número de plantas resistentes. O conjunto destas práticas deve ser utilizado visando o aumento da eficácia de controle das plantas de capim-arroz resistentes a herbicidas e conseqüente diminuição do número de plantas que possam disseminar a resistência dentro e entre áreas de cultivo, seja através do fluxo dos genes de resistência para plantas suscetíveis ou mesmo via produção e disseminação de suas sementes.

3.4 CONCLUSÕES

O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*), mesmo sendo considerado uma planta autógama, apresenta taxa de fecundação cruzada média de 3,46%, podendo chegar a 4,41% nas condições do presente estudo. A produção de sementes de *E. crus-galli* pode chegar a 23.107 sementes por planta, quando cultivadas em condições de campo a uma densidade de 1 planta/m².

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D. *et al.* Interferência de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) na cultura do arroz irrigado (*Oryza sativa*) em função da época de irrigação. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 689-696, 2007.

ALIBERT, B. *et al.* A combined method to study gene flow from cultivated sugar beet to ruderal beets in the glasshouse and open field. **European Journal of Agronomy**, v. 23, n. 1, p. 195-208, 2005.

ALTOP, E. K.; MENNAN, H. Genetic and morphologic diversity of *Echinochloa crus-galli* populations from different origins. **Phytoparasitica**, v. 39, n. 1, p. 93-102, 2011.

BAGAVATHIANNAN, M. V. *et al.* Seed production of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in response to time of emergence in cotton and rice. **The Journal of Agricultural Science**, v. 150, n. 6, p. 717-724, 2011.

BAGAVATHIANNAN, M. V.; NORSWORTHY, J. K. Pollen-mediated transfer of herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1425-1431, 2014.

BODDY, L. G. *et al.* Stratification Requirements for Seed Dormancy Alleviation in a Wetland Weed. **PLoS One**, V. 8, n. 9, p. 1-11, 2013.

BORTOLY, E. D. **Avaliação do mecanismo de resistência a imazethapyr e relações filogenéticas de capim-arroz (*Echinochloa spp.*)**. Porto Alegre: UFRGS, 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BUSI, R. *et al.* Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, vol. 117, n. 8, p. 1281-1290, 2008.

BUSI, R., *et al.* Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 106, n. 5, p. 817-824, 2011.

CAREY, V. F. **Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and bearded sprangletop (*Leptochloa fascicularis*) interference and control in rice (*Oryza sativa*)**. M.S. thesis - University of Arkansas, Fayetteville, AR, 1990.

CARPENTER, J., *et al.* Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and traditional soybeans, corn, and cotton crops. **Council for Agricultural Science and Technology**. v. 1, n. 1, 2002.

CHARLESWORTH, B. Evolutionary rates in partially self-fertilizing species. **The American Naturalist**, v. 140, n. 1, p. 126-148, 1992.

CHAUHAN, B. S. Shade reduces growth and seed production of *Echinochloa colona*, *Echinochloa crus-galli*, and *Echinochloa glabrescens*. **Crop Protection**, v. 43, n. 1, p. 241-245, 2013.

CHAUHAN, B. S.; JOHNSON, D. E. Growth and Reproduction of Junglerice (*Echinochloa colona*) in Response to Water Stress. **Weed Science**, v. 58, n. 2, n. 132-135, 2010.

CHAUVEL, B.; GASQUEZ, J. Relationships between genetic polymorphism and herbicide resistance within *Alopecurus myosuroides* huds. **Heredity**, v. 72, n. 1, p. 336–344, 1994.

CHEN, L. J. *et al.* Gene Flow from Cultivated Rice (*Oryza sativa*) to its Weedy and Wild Relatives. **Annals of Botany**, v. 93, n. 1, p. 67-73, 2004.

DAVIS, A. *et al.* Cropping system effects on giant foxtail (*Setaria faberi*) demography: II. Retrospective perturbation analysis. **Weed Science**, v. 51, n. 1, p. 930-939, 2003.

DÉLYE, C. *et al.* Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**. v. 29, n. 11, p. 649-658, 2013.

DUKE, J. A. **Handbook of energy crops**. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. 1983, 224p.

FISCHER, A. *et al.* Suppression of Junglerice [*Echinochloa colona* (L.) Link] by irrigated rice cultivars in Latin America. **Agronomy Journal**, v. 89, n. 3, p. 516–521, 1997.

GALLANDT, E. R. How can we target the weed seedbank?. **Weed Science**, v. 54, n. 3, p. 588-596, 2006.

GEALY, D. R. *et al.* Gene flow Between Red Rice (*Oryza sativa*) and Herbicide-Resistant Rice (*O. sativa*): Implications for Weed Management. **Weed Technology**, v. 17, n. 3, p. 627-645, 2003.

GOULART, I. C. G. R. **Fluxo gênico e variação adaptativa de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) resistentes aos herbicidas imidazolinonas**. Dissertação (Mestrado-Herbologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia. UFRGS. Porto Alegre: I. C. G. dos R. Goulart, 2011.

HART, S. *et al.* Semidominant nature of monogenic sulfonylurea herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*). **Weed Science**, v. 41, n. 3, p. 317-324, 1993.

HOLM, L. G., *et al.* Ed. 1. **The World's Worst Weeds: Distribution and Biology**. Honolulu, USA: University Press of Hawaii, p. 609, 1977.

JASIENIUK, M. *et al.* The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, n. 1, p. 176-193, 1996.

JHALA, A. J. *et al.* Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist?. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 557-566, 2011.

- KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 33 p, 1996.
- LANGVIN, S. A. *et al.* The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). **Evolution**, v. 44, n. 4, p. 1000-1008, 1990.
- LATTA, R. G. *et al.* Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of Ponderosa pine. **Evolution**, v. 52, n. 1, p. 61-67, 1998.
- MATZENBACHER, F. O. *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2014.
- MAUN, M. A.; BARRETT, S. C. H. The biology of canadian weeds. 77. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 66, n. 3, p. 739-759, 1986.
- MEROTTO JR., A. *et al.* Estimating the outcrossing rate of *Cyperus difformis* using resistance to ALS-inhibiting herbicides and molecular markers. **Weed Research**, v. 49, n. 1, p. 29-36, 2009.
- MESSEGUER, J. *et al.* A Field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM Rice to conventional Rice and the red Rice weed. **Molecular Breeding**, v. 13, n. 1, p. 103-112, 2004.
- MESSEGUER, J. *et al.* Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. **Theoretical and applied genetics**, n. 103, p. 1151-1159, 2001.
- MITHILA, J.; GODAR, A. S. Understanding Genetics of Herbicide Resistance in Weeds: Implications for Weed Management. **Advances in Crop Science and Technology**, p. 1-4, 2013.
- MITICH, L. W. Intriguing world of weeds: barnyardgrass. **Weed Technology**, v. 4, n. 1, p. 918-920, 1990.
- MIZUTANI, M.; OHTA, D. Diversification of P450 genes during land plant evolution. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 291-315, 2010.
- MORTIMER, A. M. **Review of graminicide resistance**, 1998. Disponível em: <<http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm>>. Acesso em 18 maio de 2015.
- NEVE, P. *et al.* Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1385-1393, 2014.

PRESTON, C. Inheritance and linkage of metabolism-based herbicide. **Weed Science Society of America**, v. 51, n. 1, p. 4-12, 2003.

ROLAS. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. ed. 10 Porto Alegre, 2004.

SHIVRAIN, V. K. *et al.* Factors affecting the outcrossing rate between Clearfield (TM) rice and red rice (*Oryza sativa*). **Weed Science**, v. 57, n. 4, p. 394-403, 2009.

SMITH, C. *et al.* Experimental Methods to Study Gene Flow. **Weed Science**, v. 63, n. 1, p. 12-22, 2015.

SOSBAI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**. XXIX Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado. Itajaí: SOSBAI, 179 p, 2012.

SOSNOSKIE, L. M. *et al.* Pollen Grain Size, Density, and Settling Velocity for Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, v. 57, n. 1, p. 404-409, 2009.

SPOONER, D. *et al.* **Molecular markers for genebank management**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126p.

STEWART, C. N. *et al.* Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 1, p. 806-817, 2003.

TRANEL. P.J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides, What have we learned?. **Weed Science**, v. 50, n. 6, p. 700-712, 2002.

WRIGHT, T. R.; PENNER, D. Corn (*Zea mays*) acetolactate synthase sensitivity to four classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 46, n. 1, p. 8-12, 1998.

YU, Q.; POWLES, S. B. 2014 - Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1340-1350, 2014.

YUAN, J. S. *et al.* Non-target-site herbicide resistance: a family business. **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

Capítulo 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA EM CAPIM ARROZ RESISTENTE AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS

RESUMO

O capim-arroz apresenta resistência aos herbicidas causada por local de ação alterado e incremento da metabolização em diversas regiões do mundo. As condições ambientais podem influenciar a metabolização de herbicidas pela planta e interferir na evolução da resistência e nos níveis deste processo em determinadas condições de crescimento. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da baixa temperatura em capim-arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas. O estudo foi realizado em casa-de-vegetação e em câmara de crescimento. O fator A constou de um biótipo suscetível e um resistente a herbicidas inibidores da ALS. O fator B do herbicida imazethapyr em seis doses, de zero a 800 g ha⁻¹ para o biótipo resistente e de zero a 100 g ha⁻¹ para o biótipo suscetível. O fator C foi composto de quatro condições de temperatura (16°C/16°C, 25°C/25°C, 16°C/25°C e 25°C/16°C) em que as plantas foram submetidas antes e após a aplicação do herbicida. As avaliações visuais de fitotoxicidade foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após o tratamento (DAT) e a massa seca da parte aérea aos 21 DAT. A condição de 16°C/25°C proporcionou eficiência de controle superior a 90% já aos 14DAT na dose de 6,25 g ha⁻¹. Na dose de 100 g ha⁻¹ o herbicida proporcionou controle superior a 90% na temperatura 25°C/16°C e menos de 50% a 16°C/16°C no biótipo resistente aos 21DAT. A massa seca da parte aérea (MSPA) teve redução superior a 80% nas condições 25°C/16°C e 16°C/25°C na dose recomendada do herbicida (100 g ha⁻¹) enquanto na temperatura 16°C/16°C a redução da MSPA foi inferior a 30% na mesma dose do herbicida. Condições de 16°C/16°C aumentaram a resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr, enquanto variações de temperatura que simulam um choque térmico (16°C/25°C e 25°C/16°C) diminuíram os níveis de resistência. As condições de temperatura em que as plantas são submetidas no período pré e pós-aplicação do herbicida interferem no nível de resistência ao herbicida imazethapyr em capim-arroz.

Chapter 4 - EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON THE IN BARNYARDGRASS RESISTANT TO IMIDAZOLINONE-HERBICIDES

ABSTRACT

The barnyardgrass is resistant to herbicides caused by altered site of action and increased metabolism in various regions of the world. The environmental conditions may influence the metabolism of herbicides by the plant and affect the evolution of resistance levels in this process and in certain growing conditions. The objective was to evaluate the effect of low temperature on barnyardgrass resistant to imidazolinone herbicides. The study was carried out greenhouse and growth chamber. O chamber factor A consisted of a susceptible biotype and resistant to ALS inhibitor herbicides. Factor B of the herbicide imazethapyr in six doses, from zero to 800 g ha⁻¹ for the resistant biotype and zero to 100 g ha⁻¹ for the susceptible biotypes. The C factor was composed of four temperature conditions (16°C/16°C, 25°C/25°C, 16°C/25°C and 25°C/16°C) where the plants were submitted before and after applying the herbicide. The visual injury evaluations were performed at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT) and dry mass of shoots at 21 DAT. The condition of 16°C/25°C provided control efficiency exceeding 90% 14DAT already at the dose of 6.25 g ha⁻¹. At a dose of 100 g ha⁻¹ oo herbicidal provided superior control to 90% in the temperature 25°C/16°C and less than 50% at 16 °C/16°C in resistant biotype to 21DAT. The dry weight of the aerial part (MSPA) was reduced by more than 80% under the conditions 25°C/16°C and 16°C/25°C at the recommended dose of the herbicide (100 g ha⁻¹) while the temperature 16°C/16°C reducing MSPA was less than 30 % at the same dose of the herbicide. Conditions of 16°C/16°C increased barnyardgrass resistance to imazethapyr as temperature variations that simulate a thermal shock (16°C/25°C and 25°C/16°C) decreased resistance levels. The temperature conditions in which plants are subjected in the pre- and post-application of herbicide interfere with the level of resistance to imazethapyr herbicide on barnyardgrass.

4.1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas estão relacionados principalmente com a ocorrência de mutações ou super-expressão do gene que codifica a enzima alvo, diminuição da absorção e translocação e ao aumento da metabolização do herbicida (Yuan *et al.*, 2007). O mecanismo mais frequente de resistência a herbicidas ocorre devido à mutação no local de ação que resulta em mudanças na conformação da enzima alvo e diminuição do impacto do herbicida sobre a planta (Powles & Yu, 2010). Várias substituições de bases nitrogenadas na enzima acetolactato sintase (ALS) resultam na resistência de plantas daninhas a esses herbicidas, no entanto, a magnitude da resistência varia amplamente entre as substituições (Tranel & Wrigth, 2002).

A resistência a herbicidas causada por incremento da metabolização do herbicida tem sido considerada como de alta importância, pois resulta na maioria das situações em resistência múltipla e por ser afetada com a ocorrência de estresses ambientais (Yu & Powles, 2014; Tamiru *et al.*, 2015). A resistência causada pelo aumento do metabolismo pode ser causada pelo aumento da atividade de monoxigenases endógenas do citocromo P450 (P450), glicosil transferases (GTs), glutathione S-transferases (GSTs), e/ou outros sistemas enzimáticos, tais como aril acilamidases que podem metabolizar herbicidas (Carey *et al.*, 1997; Délye *et al.*, 2013; Yu & Powles, 2014).

Enzimas P450, GTs e GSTs pertencem a grandes superfamílias com muitos papéis no metabolismo primário e secundário, além da detoxificação de herbicidas. Por exemplo, certos herbicidas podem ser diretamente inativados pela conjugação por GSTs, sendo subsequentemente transportados para vacúolos para armazenamento e/ou metabolismo adicional (Yu & Powles,

2014). Uma característica importante da resistência a herbicidas causada pelo incremento de metabolização é a ocorrência de resistência múltipla, que consiste na resistência aos herbicidas de diferentes mecanismos de ação de herbicidas. Esta é determinada pela capacidade destas enzimas em metabolizar herbicidas de grupos químicos diferentes, independentemente do seu local de ação (Hall *et al.*, 1994)

Resultados obtidos em populações de capim-arroz do Rio Grande do Sul, resistentes ao herbicida imazethapyr indicam a participação do incremento de metabolização como mecanismo de resistência aos herbicidas (Matzenbacher, 2012). Porém, em avaliações realizadas sob outras cinco populações avaliadas no mesmo experimento não foram observados estes resultados. Em estudos posteriores, foi constatado que, em duas destas populações existe a ocorrência do mecanismo de resistência ao herbicida imazethapyr relacionado à alteração do local de ação devido a ocorrência das mutações no gene ALS Ser653 e Trip574 (Bortoly, 2013). Estes resultados reforçam a ocorrência de incremento de metabolização e alterações do local de ação como mecanismo de resistência aos herbicidas em capim-arroz no Sul do Brasil.

A resistência causada pelo incremento de metabolização pode ser parte da resposta de plantas daninhas ao estresse abiótico causado pelo herbicida. A ocorrência de estresses bióticos e abióticos, ao longo de várias gerações resulta na evolução da capacidade de detecção, sinalização e resposta das plantas, que desencadeiam respostas adaptativas de sobrevivência (Vaahteraa & Brosché, 2011). Os herbicidas causam um estresse abiótico de grande intensidade, e como tal, podem desencadear mecanismos de proteção. Desta forma, os processos de metabolização de herbicidas, assim como outras formas de resistência não relacionada à alterações do local de ação fazem parte da resposta de plantas daninhas ao estresse causado pelo herbicida. Isto é confirmado pelos estudos sobre os efeitos das aplicações de herbicidas na planta, mostrando que a resposta ao estresse herbicida pode ser comparada com a resposta a outros tipos de estresses abióticos (Das *et al.*, 2010; Vivancos *et al.*, 2011).

As plantas desenvolveram vários mecanismos que induzem respostas imediatas, aclimação e adaptação, permitindo a sobrevivência à diferentes

condições de estresse ambiental. Estes mecanismos existem como um conjunto de defesas de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Milner *et al.* 2007). As bases moleculares desses mecanismos de sobrevivência relacionadas a metabolização são de interesse quando associados com a tolerância à herbicidas, visto que muitas das enzimas que atuam na proteção contra estresses ambientais em plantas (P450, GST) desempenham também papel relevante na resistência à herbicidas (Milner *et al.*, 2007).

Atualmente nas regiões de cultivo de arroz-irrigado no sul do Brasil observa-se cada vez mais a antecipação dos períodos de semeadura da cultura do arroz. No entanto, nestas condições expõem-se as plantas a condições climáticas diferentes das consideradas normais ao seu desenvolvimento. Em relação a ocorrência de baixas temperaturas do ar, no Rio Grande do Sul, o risco da ocorrência de temperaturas baixas abrange todo o Estado, principalmente as regiões do Litoral-Sul e da Campanha, onde temperaturas inferiores a 15°C durante a noite são frequentes (SOSBAI, 2014). Desta forma, o manejo de plantas daninhas através da aplicação de herbicidas também está sujeita, em muitos casos, à interferência destes estresses abióticos, em especial a baixas temperaturas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de estresses abióticos causados pela variação de temperatura em populações de capim arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

O estudo foi realizado em casa-de-vegetação e em câmara de crescimento no Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Porto Alegre, RS.

Foram utilizadas duas populações de capim arroz da espécie *E. crus-galli*, sendo uma oriunda de Arroio Grande, RS (ARRGR-01) e outra de Mostardas do Sul, RS (MOSTS-01). Ambas as populações foram pré-classificadas quanto ao seu nível de resistência aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas por Matzenbacher *et al.* (2014), sendo que a

população ARRGR-01 possui resistência a estes herbicidas pelo metabolismo diferencial (detoxificação) destes herbicidas causada pelo incremento de metabolização causada por enzimas citocromo P450. Esta população não apresenta mutações no gene ALS associadas com resistência a herbicidas (Matzenbacher *et al.* 2014). A população MOSTS-01 é suscetível a herbicidas imidazolinonas.

As sementes foram germinadas em recipientes erlenmeyer, submersas em solução de NO_3^- (2%) e mantidas em câmara de incubação a temperatura de 25°C por cinco dias. Posteriormente, as plantas foram transplantadas em recipientes plásticos de 250 mL preenchidos com solo Gleissolo Háplico Ta distrófico típico coletado na Estação Experimental do Arroz, Cachoeirinha, RS (EEA-IRGA). Cada unidade experimental correspondeu a um recipiente plástico com uma planta. As unidades experimentais foram acondicionadas em bandejas com lâmina de água com aproximadamente dez centímetros. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura controlada em torno de 25°C. A adubação e os demais tratamentos culturais seguiram as recomendações técnicas da pesquisa para a cultura do arroz na região Sul do Brasil (SOSBAI, 2014).

4.2.2 Condução do experimento

O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados arranjados em esquema fatorial, com quatro repetições. O fator A foi constituído por dois biótipos de capim-arroz: um biótipo suscetível (MOSTS-01) e um resistente a herbicidas inibidores da ALS (ARRGR-01). O fator B representa o herbicida imazethapyr (Pivot, 100g/L CS, BASF S.A.) nas doses de 0, 50, 100, 200, 400 e 800 g ha⁻¹ para o biótipo resistente e 0, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 g ha⁻¹ para o biótipo suscetível, com adição de surfactante não iônico Dash na dose de 0,5% v/v. O fator C foi constituído de quatro diferentes sistemas de aclimação (Tabela 4.1) em que as plantas foram submetidas no período anterior e posterior à aplicação do herbicida. Os tratamentos de temperatura foram adaptados de Ge *et al.* (2011) e Vila-Aiub *et al.* (2012), sendo que quando as plantas de capim-arroz apresentaram 3-4 folhas

verdadeiras, as mesmas foram submetidas aos tratamentos, separados sob diferentes condições de temperatura.

TABELA 4.1 Tratamentos realizados para determinar o efeito de temperatura em capim-arroz resistente a herbicidas imidazolinonas.

Tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento
1 - Frio/Frio ¹	16°C	16°C
2 - Frio/Normal	16°C	25°C
3 - Normal/Normal	25°C	25°C
4 - Normal/Frio	25°C	16°C

¹ Temperatura antes e após a aplicação do herbicida.

Cada grupo de plantas foi mantido sob condições artificiais em câmara de crescimento controlado, simulando: condições de estresse por baixas temperaturas (16 °C dia/noite, fotoperíodo de 10/14 h) ou condições normais de temperatura para seu desenvolvimento (25°C dia/noite, fotoperíodo de 10/14h).

Como parte das combinações de aclimação utilizadas no presente estudo, as plantas permaneceram durante sete dias nas respectivas temperaturas de pré-tratamento (Tabela 4.1) anterior a aplicação do herbicida.

Posteriormente cada grupo foi submetido à aplicação das diferentes doses de herbicidas e então submetidas a segunda parte dos tratamentos de aclimação (pós-tratamento). A aplicação do herbicida foi realizada em câmara de aplicação pressurizada com CO₂, com bicos “E” 110,02 mantido à pressão constante de 200 kPa e calibrado para vazão de 200 L/ha. As avaliações visuais de fitotoxicidade foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após o tratamento (DAT).

A análise da fitotoxicidade foi realizada através de avaliações visuais em escala percentual, onde zero corresponde a ausência de danos e 100 % à morte da planta. Ao final do experimento foi avaliado o peso da massa seca da parte aérea (MSPA). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância. Os dados foram ajustados para equação log-logística (Equação 1) ou sigmóide (Equação 2) de três parâmetros, através do programa Sigma Plot versão 10.0:

$$Y = \frac{a}{1 + (X/Xa_{50})^b} \quad \text{Equação 1}$$

onde: Y = variável dependente (controle ou MSPA); X = variável independente (dose herbicida (g ha⁻¹)); a = assíntota de máxima; b = declividade da curva; Xa₅₀ = dose herbicida (g ha⁻¹) responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima (a). O valor da dose responsável por reduzir 50% do controle (C₅₀), ou reduzir 50% a MSPA dos biótipos (GR₅₀) foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes.

$$Y = \frac{a}{1 + \exp^{-(X-Xa_{50})/b}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: Y = variável dependente (controle ou MSPA); X = variável independente (dose herbicida (g ha⁻¹)); a = diferença entre as assíntotas de máxima e mínima; b = declividade da curva; Xa₅₀ = dose herbicida (g ha⁻¹) responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima (a). O valor da dose responsável por reduzir 50% do controle (C₅₀) ou reduzir 50% a MSPA dos biótipos (GR₅₀) foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes. O fator de resistência (FR) foi calculado através de C₅₀R/C₅₀S, GR₅₀R/GR₅₀S.

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise da variância indicou significância dos fatores dose do herbicida, população de capim-arroz e temperatura, e também da interação entre estes três fatores para todas as variáveis analisadas. Isto evidencia que há efeito diferenciado das doses do herbicida imazethapyr sobre a tolerância relativa das plantas de capim-arroz em função das diferentes condições de temperatura (Tabela 4.2).

TABELA 4.2. Equação^a utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C₅₀) ou 50% de redução do crescimento (GR₅₀) das plantas dos biótipos de capim-arroz resistentes e suscetíveis ao herbicida imazethapyr. Porto Alegre, 2015.

Biótipo	a	b	Xa ₅₀	C ₅₀	R ^{2b}	FR ^c	Itr ^d
7 DAT							
Suscetível 25°C/16°C	130,126	-0,368	6,07	1,685	0,99	-	28
Suscetível 16°C/25°C	75,116	1,534	2,521	1,609	0,98	-	27
Suscetível 16°C/16°C	34,468	-1,293	4,457	>100,000	0,98	-	28
Suscetível 25°C/25°C	126,899	-0,458	35,523	13,878	0,99	-	31
Resistente 25°C/16°C	57,717	-0,865	78,203	678,264	0,99	402,48	28
Resistente 16°C/25°C	30,351	-0,357	22,218	>800,000	0,99	>497,10	27
Resistente 16°C/16°C	51,900	-0,829	4579,657	>800,000	0,95	-	26
Resistente 25°C/25°C	48,710	-0,654	341,667	>800,000	0,98	>57,65	29
14 DAT							
Suscetível 25°C/16°C	100,287	-1,718	1,484	1,479	0,99	-	29
Suscetível 16°C/25°C	111,191	-0,694	3,938	2,944	0,98	-	27
Suscetível 16°C/16°C	101,886	-1,119	0,805	0,779	0,99	-	27
Suscetível 25°C/25°C	102,449	-0,809	0,972	0,916	0,99	-	30
Resistente 25°C/16°C	74,337	-0,708	11,032	30,502	0,99	20,62	37
Resistente 16°C/25°C	122,107	-0,216	231,462	42,495	0,98	14,44	24
Resistente 16°C/16°C	42,126	-0,248	1007,239	>800,000	0,98	>1027,22	32
Resistente 25°C/25°C	55,027	-1,171	60,442	429,846	0,98	469,16	27
21 DAT							
Suscetível 25°C/16°C	100,064	-2,443	1,923	1,922	0,99	-	33
Suscetível 16°C/25°C	100,034	-3,632	3,772	3,771	0,99	-	25
Suscetível 16°C/16°C	118,110	-0,618	5,015	3,041	0,99	-	33
Suscetível 25°C/25°C	100,083	-3,372	4,244	4,242	0,99	-	36
Resistente 25°C/16°C	101,751	-0,838	5,833	5,598	0,99	2,91	33
Resistente 16°C/25°C	145,159	-0,200	202,227	8,099	0,99	2,15	32
Resistente 16°C/16°C	100,079	-0,658	102,011	101,767	0,98	33,46	29
Resistente 25°C/25°C	184,332	-0,364	626,822	41,495	0,99	9,78	32
Biótipo	a	b	Xa ₅₀	GR ₅₀	R ^{2b}	FR ^c	Itr ^d
MSPA							
Suscetível 25°C/16°C	99,999	0,222	0,0018	0,002	0,99	-	16
Suscetível 16°C/25°C	100,021	0,805	0,3191	0,319	0,98	-	18
Suscetível 16°C/16°C	99,970	0,854	2,444	2,442	0,98	-	13
Suscetível 25°C/25°C	100,090	1,008	0,217	0,217	0,99	-	18
Resistente 25°C/16°C	99,998	0,225	0,0164	0,016	0,98	9,11	23
Resistente 16°C/25°C	100,002	0,629	6,268	6,268	0,99	19,63	29
Resistente 16°C/16°C	102,218	1,448	73,2631	75,492	0,90	30,91	24
Resistente 25°C/25°C	99,858	0,792	33,1667	33,048	0,99	152,02	12

^a Equação sigmoideal $Y = a / (1 + (X/Xa_{50})^b)$. ($p < 0,0001$).

^b Coeficiente de determinação.

^c Fator de resistência = C_{50R} / C_{50S} .

^d Itr = número de interações utilizadas para ajustar os parâmetros da equação.

Aos 7 DAT observam-se diferenças significativas na porcentagem de controle das plantas entre as diferentes condições de temperatura em que as plantas foram expostas (Figura 4.1). Para o biótipo suscetível, o máximo controle visual foi observado quando as plantas foram expostas a condição de 25°C/16°C. Nesta condição com apenas 25% da dose recomendada de imazethapyr (25 g ha⁻¹) observou-se controle superior a 80%, resultando em baixo C₅₀ (1,685).

O controle das plantas pelo herbicida em condições de temperatura de 25°C/25°C e 16°C/25°C apresentou comportamento intermediário, porém diferenciado quando observados em doses reduzidas de 6,25 a 25,0 g ha⁻¹. Nas menores doses do herbicida avaliadas as plantas submetidas a variação de temperatura 16°C/25°C apresentaram eficiência de controle superior quando comparada a condição “normal” de temperatura (25°C/25°C), apresentando acréscimo superior a 20% no controle, na menor dose avaliada (6,25 g ha⁻¹) (Figura 4.1). Esta resposta refletiu nos valores de C₅₀, onde a 25°C/16°C o C₅₀ foi de 1,685, enquanto a 25°C/25°C o valor foi muito superior (13,878). No entanto, quando as mesmas foram comparadas na maior dose utilizada no presente estudo, não se observaram diferenças significativas entre as temperaturas analisadas em relação a eficiência de controle das plantas de capim-arroz. Na condição de baixa temperatura (16°C/16°C), independente da dose de herbicida utilizada, o controle não ultrapassou 40% aos 7 DAT, mostrando-se o tratamento com menor eficiência de controle nesta avaliação (C₅₀ >100 g ha⁻¹) (Figura 4.1).

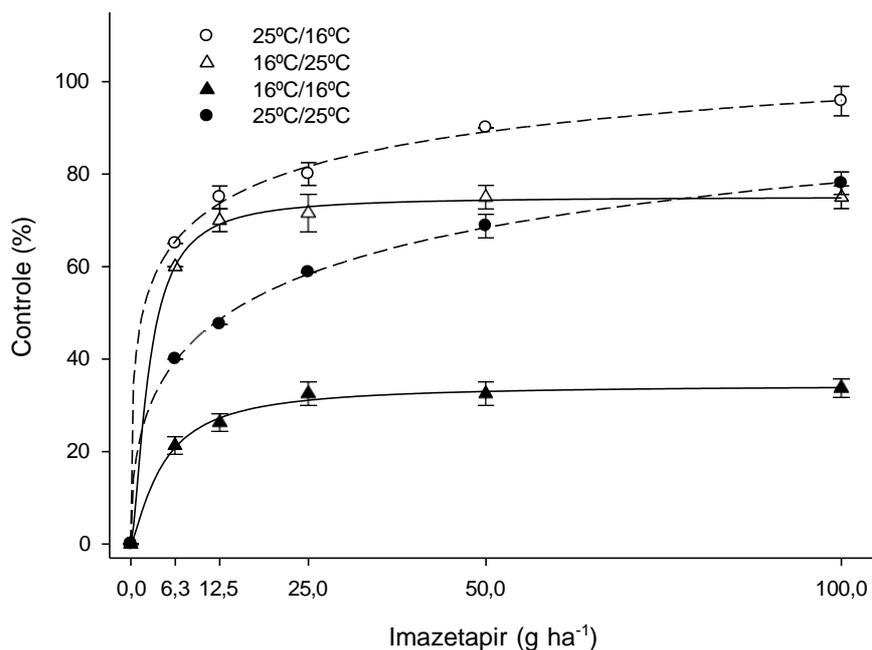


FIGURA 4.1. Eficiência de controle (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazetapir em resposta a diferentes condições de temperatura aos 7 DAT. Porto Alegre, 2015.

O biótipo resistente demonstrou o mesmo comportamento do suscetível em relação as variações no controle em resposta aos tratamentos de temperatura a qual as plantas foram submetidas (Figura 4.2). O maior valor observado para a avaliação visual aos 7 DAT ocorreu quando as plantas foram submetidas a temperatura 25°C/16°C, sendo que nestas condições, apenas quando utilizou-se 800 g ha⁻¹ do herbicida, o controle observado foi superior aos 50%, confirmando a ocorrência de resistência aos herbicidas imidazolinonas. A temperatura de 16°C/16°C proporcionou o menor controle, não alcançando 20% de eficiência de controle aos 7 DAT (Figura 4.2). Em condições de baixa temperatura constante, praticamente não houve efeito visual da ação do herbicida nas plantas do biótipo resistente. Apenas com a utilização de 8 vezes a dose recomendada do herbicida o controle observado foi superior a 10% em relação a testemunha sem aplicação.

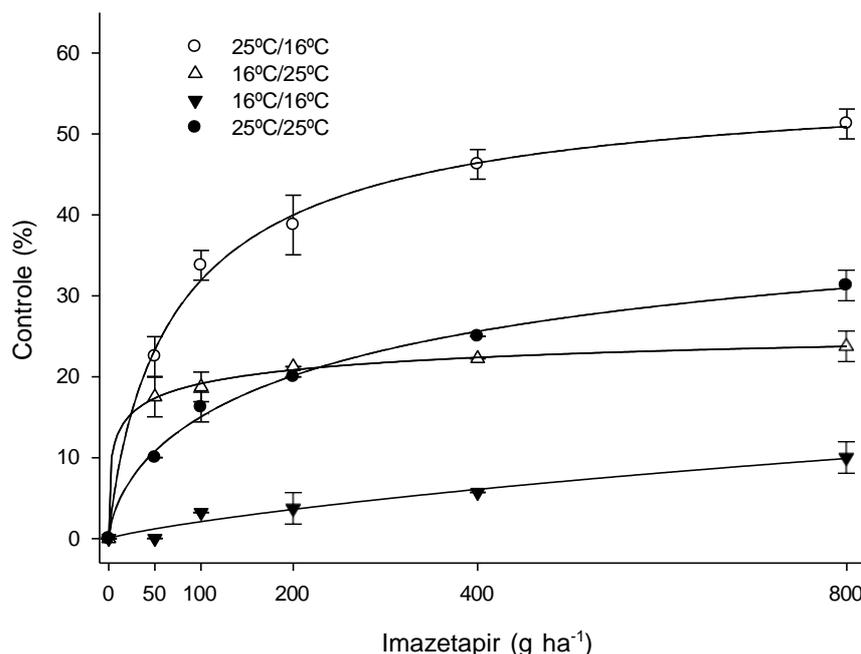


FIGURA 9. Eficiência de controle (%) de capim-arroz resistente pelo herbicida imazetapir em resposta a diferentes condições de temperatura aos 7DAT. Porto Alegre, 2015.

O baixo controle observado aos 7 DAT pode ser explicado pelo fato de que em condições de estresse, principalmente sob baixa temperatura, as plantas reduzem naturalmente sua taxa de crescimento em um primeiro momento, havendo uma redução do consumo de aminoácidos necessários ao seu desenvolvimento. As avaliações aos 7 DAT para herbicidas ALS podem não ser totalmente representativas, pois a ação deste herbicida ocorre logo após a aplicação, todavia, os sintomas começam a aparecer no período de sete a 14 dias após a aplicação, sendo que em baixas temperaturas, esse período pode ser ainda maior (Vidal & Merotto Jr., 2001). Neste caso, possivelmente na avaliação aos 7 DAT, mesmo com a inibição da enzima ALS pelo herbicida, a quantidade de aminoácidos presentes na planta, associados a redução da taxa de crescimento das mesmas, resulta em redução e/ou retardamento do efeito visual deste herbicida. Esta hipótese é baseada a partir de um entendimento de que as enzimas, como catalisadoras de reações, são dependentes da temperatura e que o metabolismo da planta, o qual é

dependente das enzimas, provavelmente também irá ser dependente da temperatura de forma similar.

O efeito da temperatura sobre a função de enzimas foi previamente sugerida como um fator de resposta das plantas a variações térmicas. Os conhecimentos dos efeitos da variação térmica em parâmetros cinéticos da enzima na resposta das plantas às temperaturas tem sido utilizados para prever e compreender o papel da temperatura em um pequeno número de processos de toda a planta, incluindo emergência de plântulas (Mahan, 2000), manejo da irrigação (Upchurch *et al.*, 1990), e crescimento de tecidos estiolados (Burke & Oliver 1993). Não há razões a priori para esperar que os herbicidas, cuja função é dependente da atividade de enzimas não estejam sujeitos às limitações térmicas semelhantes aos que foram encontrados para limitar a função de enzimas envolvidas no crescimento e desenvolvimento da planta.

Aos 14 DAT o biótipo suscetível apresentou, já para a menor dose de imazethapyr ($6,25 \text{ g ha}^{-1}$), controle superior a 80% para a maior parte dos tratamentos de temperatura, com exceção da condição de $16^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$, onde este nível de controle foi observado apenas quando aumentou-se a dose do herbicida para 25 g ha^{-1} (Figura 4.3). Esta resposta pode ser observada através dos resultados de C_{50} , onde a condição de $16^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ proporcionou o maior valor de C_{50} dentre todas as condições de temperatura testadas (2,944). Estes resultados evidenciam o alto nível de sensibilidade deste biótipo ao herbicida imazethapyr. O biótipo resistente demonstrou diferenças mais contrastantes aos 14 DAT ao que se refere às diferentes condições de temperatura a que as plantas foram submetidas (Figura 4.4). Mesmo na máxima dose do herbicida utilizada, nenhum dos tratamentos proporcionou controle superior a 80%. Os tratamentos de $25^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$ e $16^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ proporcionaram os maiores valores de controle nesta avaliação, respectivamente, sendo os únicos a proporcionar controle superior a 50% utilizando-se apenas 50% da dose recomendada do herbicida. Na avaliação de 14 DAT observa-se mais claramente que os tratamentos onde houve alteração da temperatura durante a condução do experimento ($25^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$ e $16^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$) proporcionaram controles superiores inclusive no tratamento de temperatura constante e normal ao desenvolvimento da cultura ($25^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$), o qual foi inferior a 50% mesmo sob as maiores doses do herbicida (Figura 4.4).

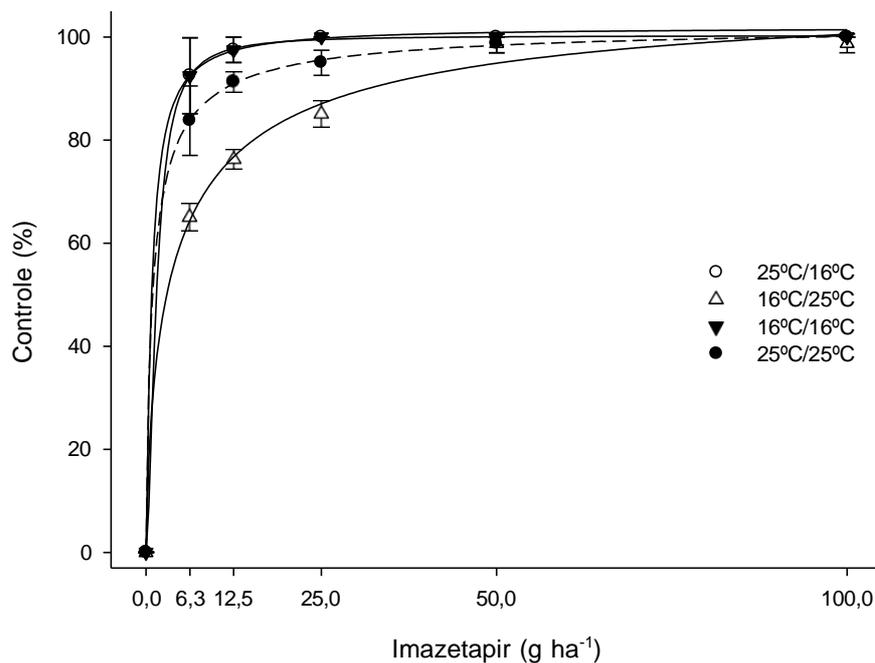


FIGURA 10. Eficiência de controle (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazetapir em resposta a diferentes condições de temperatura aos 14DAT. Porto Alegre, 2015.

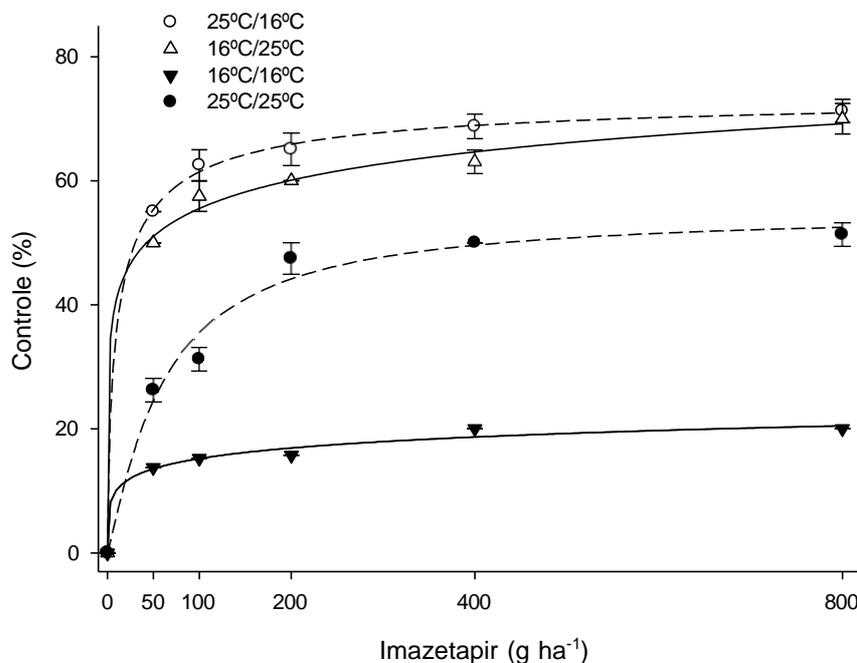


FIGURA 4.4. Eficiência de controle (%) de capim-arroz resistente pelo herbicida imazetapir em resposta a diferentes condições de temperatura aos 14 DAT. Porto Alegre, 2015.

A condição de temperatura constante considerada “normal” (25°C/25°C) apresentou resposta intermediária na eficiência e controle aos 14 DAT para o biótipo resistente quando comparada aos demais tratamentos de temperatura (Figura 4.4). A mesma apresentou controle inferior quando comparado as condições de mudança de temperatura (25°C/16°C e 16°C/25°C), porém apresentando mais que o dobro de controle quando comparado a condição de baixa temperatura constante (16°C/16°C). Este desempenho pode ser visualizado através dos resultados do fator de resistência (FR), onde a condição 25°C/25°C apresentou FR de 469,155, sendo este superior a 25°C/16°C e 16°C/25°C (20,62 e 14,44, respectivamente), porém não superando o FR observado na condição de 16°C/16°C (1.027,22) (Tabela 4.2). Sob condições constantes de baixa temperatura o biótipo resistente mostrou-se altamente tolerante ao herbicida imazethapyr, somente ultrapassando 20% de controle quando utilizado oito vezes a dose do herbicida aos 14 DAT.

Destaca-se que na avaliação aos 14 DAT pode-se observar a significativa discrepância nos resultados observados entre os biótipos suscetível e resistente, sendo estas diferenças observadas não somente no nível de controle como também entre os tratamentos de diferentes temperaturas. Os resultados observados aos 14 DAT demonstram o efeito da temperatura no mecanismo de resistência das plantas de capim-arroz, visto que somente as plantas contendo a característica de resistência apresentaram tais variações de controle em função das diferentes temperaturas avaliadas.

Aos 21 DAT, com exceção do tratamento 16°C/16°C, todos os demais tratamentos de temperatura no biótipo suscetível apresentaram controle próximo a 100% já nas primeiras doses utilizadas no presente estudo (6,25 g ha⁻¹) não diferindo significativamente entre si (Figura 4.5). Para a condição de baixa temperatura constante (16°C/16°C), ocorreu pequena variação quando comparada as demais condições de temperatura apenas nas menores doses utilizadas (6,25 a 50 g ha⁻¹). Estas variações podem ser observadas devido a utilização de sub-doses as quais foram empregadas para avaliar justamente pequenas respostas que as plantas suscetíveis não demonstrariam se expostas as mesmas doses do biótipo resistente.

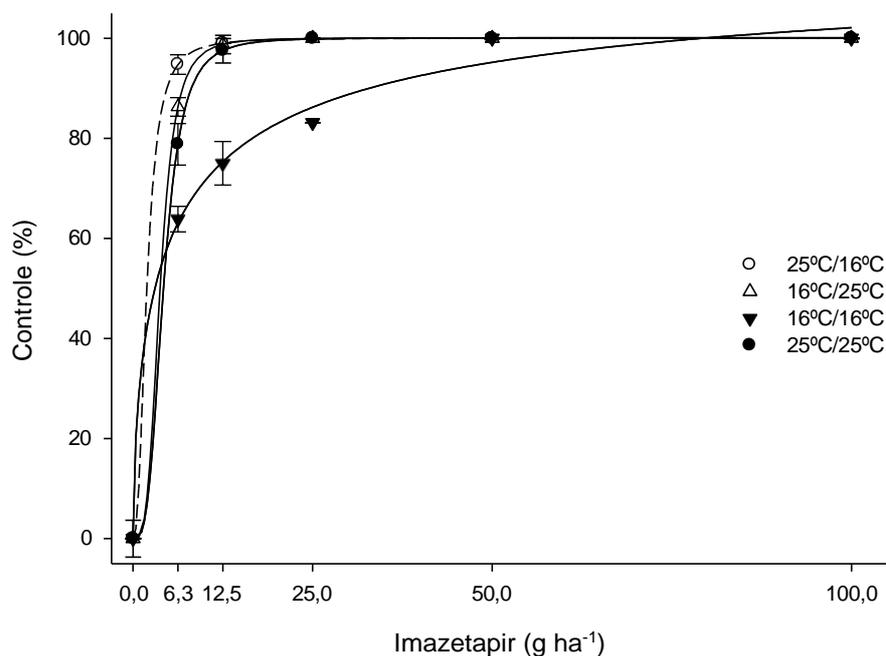


FIGURA 4.5. Eficiência de controle (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 21 DAT. Porto Alegre, 2015.

Na avaliação realizada aos 21 DAT para o biótipo resistente foi observado efeito da temperatura no nível de resistência das plantas ao herbicida imazethapyr (Figura 4.6). A temperatura de 25°C/16°C proporcionou os maiores valores de controle nesta avaliação, assim como observado nas avaliações aos 7 DAT e 14 DAT, chegando a valores próximos a 100% de controle quando utilizada a dose recomendada do herbicida (100 g ha⁻¹). Estes resultados refletiram-se no baixo FR apresentado (2,91). Este tratamento apresentou controle superior a todas as demais condições de temperaturas avaliadas no experimento na dose recomendada do herbicida (100 g ha⁻¹), diferindo significativamente (>0,05) das mesmas.

Sob condições “normais” de desenvolvimento (25°C/25°C) o biótipo resistente apresentou aumento da eficiência de controle quando comparado às avaliações de 7 e 14 DAT, alcançando valores superiores a 90% de controle quando utilizadas as maiores doses do herbicida (800 g ha⁻¹) (Figura 4.6). As plantas submetidas a baixa temperatura constantemente até o final das avaliações apresentaram menor eficiência de controle, demonstrando alto nível

de resistência das plantas quando expostas a estas condições de temperaturas (16°C/16°C). O FR neste caso foi relativamente alto, quando comparada as demais condições de temperatura, com valores de 33,46, sendo que mesmo ao se utilizar dosagens acima de 800 g ha⁻¹ do herbicida avaliado a eficiência de controle não superou os 80% (Figura 4.6).

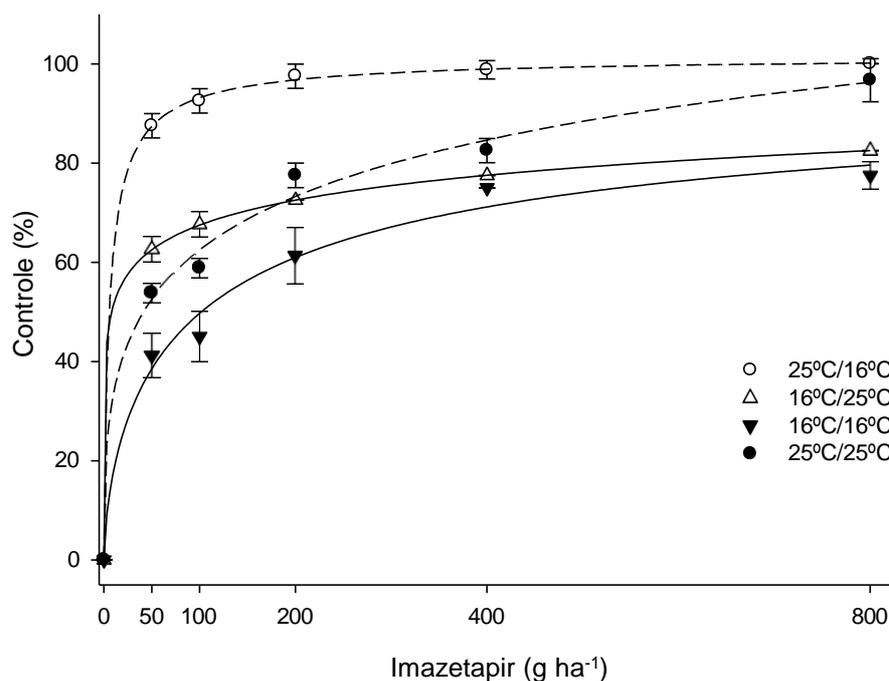


FIGURA 11. Eficiência de controle (%) de capim-arroz resistente pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura aos 21DAT. Porto Alegre, 2015.

Da mesma forma como observado na avaliação aos 14 DAT, os resultados obtidos para as temperaturas 25°C/16°C e 16°C/16°C aos 21 DAT foram distintos quando comparados a temperatura constante considerada normal ao desenvolvimento das plantas de capim-arroz (25°C/25°C) (Figura 4.6). Isto torna evidente o efeito não somente das baixas temperaturas como também o efeito de “choque térmico” sobre o nível de tolerância destas plantas ao herbicida utilizado no estudo.

Os resultados observados nas avaliações de eficiência de controle refletiram no crescimento das plantas, e por consequência, na produção de massa seca total da parte aérea. A menor redução de massa seca relativa

tanto para o biótipo suscetível quanto para o biótipo resistente foi observada na condição de 16°C/16°C, onde observa-se redução em torno de 60% para o biótipo suscetível e 20% para o resistente na menor dose do herbicida utilizada (50 g ha⁻¹ para o resistente e 6,25 g ha⁻¹ para o suscetível) (Figura 4.7 e 4.8).

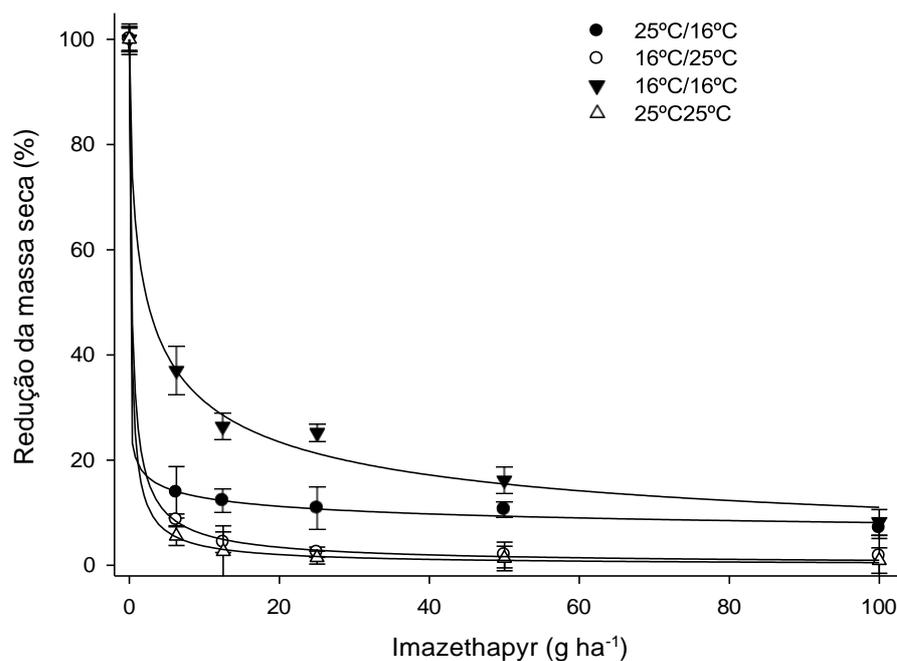


FIGURA 12. Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de capim-arroz suscetível pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura. Porto Alegre, 2015.

A avaliação de massa seca no biótipo suscetível confirma os resultados de eficiência de controle, onde já aos 14 DAT observa-se controles superiores a 90% nas condições de 16°C/25°C e 25°C/16°C (Figura 4.3), resultando assim em grandes reduções nos valores de MSPA observados (Figura 4.7).

Os efeitos mais discrepantes para ambos os biótipos na temperatura de 16°C/16°C foram observados nas menores doses utilizadas no experimento, sendo que para o biótipo resistente maiores diferenças foram observadas até a dose de 100 g ha⁻¹ (Figura 4.8) e para o biótipo suscetível na dose de 25 g ha⁻¹ (Figura 4.7). Nesse sentido, doses reduzidas do herbicida proporcionam a ocorrência do efeito de interações da temperatura sobre a tolerância de capim-

arroz ao herbicida imazethapyr, sendo que nas doses elevadas do herbicida, estes resultados podem ser mascarados pelo alto controle das plantas.

Os tratamentos que proporcionaram maior redução da massa seca das plantas de capim-arroz foram as condições que simulam o choque térmico (16°C/25°C e 25°C/16°C), onde já na menor dose do herbicida ocorreu redução superior a 90% para as duas temperaturas, no biótipo suscetível, não havendo diferença estatística entre si (Figura 4.7). Da mesma forma, a maior redução da MSPA foi observada a 16°C/25°C e 25°C/16°C no biótipo resistente, resultando em reduções da MSPA acima de 70% para 16°C/25°C e 80% em 25°C/16°C (Figura 4.8). Estes resultados refletiram nos valores de FR, onde as condições de 25°C/16°C e 16°C/25°C apresentaram baixo FR na avaliação de MSPA (9,11 para 25°C/16°C e 19,63 para 16°C/25°C) quando comparados as demais condições de temperatura utilizadas no experimento (Tabela 4.2). Diferenças significativas entre 16°C/25°C e 25°C/16°C no biótipo resistente foram observadas apenas na menor dose do herbicida utilizada (50 g ha⁻¹), sendo que a partir de 400 g ha⁻¹ todos os tratamentos de temperatura proporcionaram redução da MSPA superior a 80%.

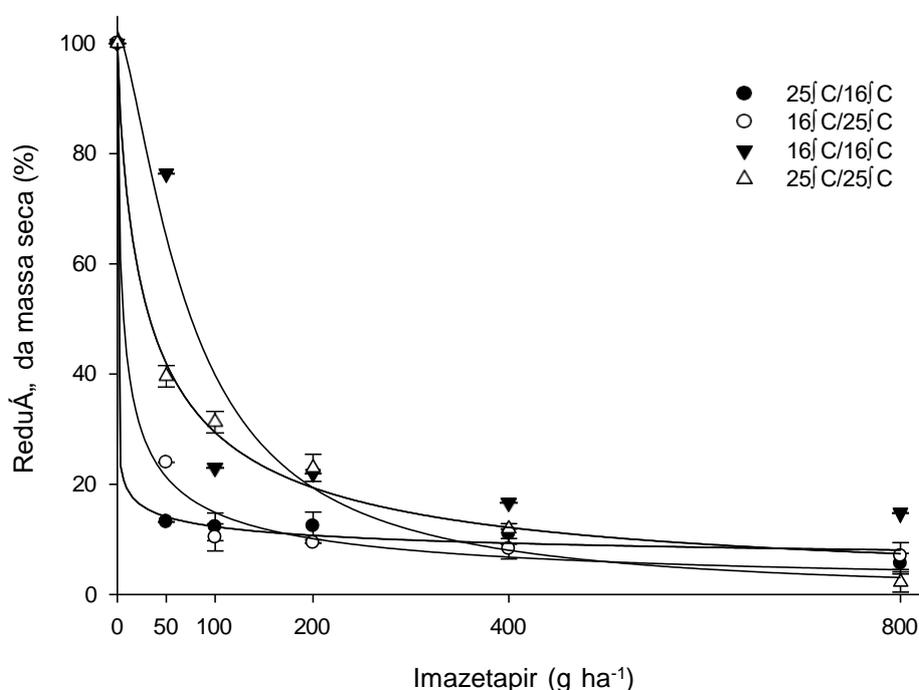


FIGURA 13. Redução da massa seca da parte aérea (MSPA) (%) de capim-arroz resistente pelo herbicida imazethapyr em resposta a diferentes condições de temperatura. Porto Alegre, 2015.

O mecanismo de tolerância ao imazethapyr em plantas de *Echinochloa crus-galli* envolve, pelo menos em parte, a degradação do herbicida através de enzimas citocromo P450 (Matzenbacher *et al.*, 2014) e especula-se que as condições de temperatura em que as plantas foram submetidas no período anterior e posterior a aplicação do herbicida alterem a capacidade metabólica das plantas e a sua habilidade em degradar o herbicida. De acordo com os resultados observados no presente estudo, três condições de temperaturas mostraram-se mais discrepantes nas avaliações realizadas, sendo que os menores resultados de controle em geral foram observados na condição 16°C/16°C e os maiores valores de controle nas temperaturas 25°C/16°C e 16°C/25°C respectivamente.

Na condição de 16°C/16°C, a qual simula condições de estresse por baixa temperatura, foram consideradas duas hipóteses para explicar os resultados observados. A **primeira explicação** para o menor valor de controle observado nas plantas de capim-arroz pelo herbicida imazethapyr é de que, condições de baixa temperatura prejudicam a absorção e a translocação do herbicida aumentando sua eficácia. Resultados semelhantes foram observados quando avaliou-se a eficácia do herbicida penoxsulam sobre o controle de *Alternanthera philoxeroides*, onde o controle em faixa de temperatura situada entre 21/11°C e 30/25°C (dia/noite), mostrou-se inversamente proporcional à temperatura (Willingham *et al.*, 2008). Em *Avena fátua*, por exemplo, a absorção e translocação de fenoxaprop-etil e imazamethabenz-metil foram reduzidas quando as plantas foram submetidas a uma condição de baixa temperatura (5/10°C), este resultado não ocorreu em condições de temperatura mais elevada (30/20°C) (Xie *et al.*, 1996). Os resultados demonstram que as condições ambientais de aplicação podem alterar a eficácia dos herbicidas, alterando a eficiência de absorção e translocação das plantas, podendo o estresse possuir influências na composição cuticular da folha e penetração foliar, diminuindo assim a absorção do herbicida.

Na condição de baixa temperatura (16°C/16°C) observou-se também desenvolvimento vegetativo reduzido das plantas. O menor crescimento pode resultar em menor área foliar específica das plantas de capim-arroz, a qual está

relacionada com a taxa de crescimento da planta. Este fator pode apresentar estreita correlação com a eficácia do herbicida, devido ao fato de que a menor área foliar específica proporcionaria menor área de contato para deposição das gotas de pulverização, diminuindo assim a quantidade do herbicida depositado por planta, reduzindo a quantidade total de herbicida absorvido pela planta e restringindo a absorção do herbicida. Este efeito foi observado em *Polygonum persicaria*, onde as plantas que se encontravam em condições de estresse antes da aplicação do herbicida metribuzim apresentaram menor taxa de crescimento assim como menor controle pelo herbicida (Riethmuller-Haage *et al.*, 2007).

A **segunda explicação** para o menor controle observado na condição de temperatura baixa (16°C/16°C) é de que, nestas condições, ocorre redução da taxa de crescimento das plantas, resultando em menor necessidade de produção de aminoácidos e consequente redução da atividade da enzima ALS, reduzindo assim os sítios de ligação da molécula do herbicida, proporcionando que as enzimas do citocromo P450 tenham mais tempo para realizar o processo de detoxificação. Resultados demonstram que a temperatura pode alterar a cinética de inibição da enzima ALS pelos herbicidas, sendo que em uma faixa de 15 a 50°C houve diferenças na atividade da enzima ALS e alterações na inibição da enzima pelo herbicida piritiobac (Light *et al.*, 1999).

Dentro da faixa de temperaturas não letais, como a temperatura avaliada (16°C/16°C), há uma série de efeitos térmicos sobre o metabolismo das plantas que são o resultado da dependência térmica das enzimas. Uma vez que a reação de detoxificação é responsável pela tolerância ao herbicida, a velocidade da reação será um fator importante que afeta o nível de tolerância observada, sendo que a tolerância aos herbicidas será o resultado tanto da tolerância conferida por enzimas de detoxificação como por limitações da eficácia que ocorrem naturalmente, cada uma das quais termicamente dependentes (Mahan *et al.*, 2004).

Na condição de baixa temperatura (16°C/16°C), em função das plantas se encontrarem em uma condição de estresse, ocorre redução do seu metabolismo. A temperatura não afeta igualmente todos os processos metabólicos da planta no momento do estresse, apresentando também efeitos sobre a cinética enzimática, sendo que a enzima alvo do herbicida e as

enzimas envolvidas na sua degradação poderiam ter sua atividade (K_m) modificada em função das condições de temperatura (Mahan *et al.*, 2004). Neste sentido, temperaturas ótimas para a atividade de enzimas detoxificadoras (P450 no caso do biótipo utilizado no presente estudo) poderiam ser sub-ótimas para a atividade da enzima alvo do herbicida, favorecendo assim o aumento da tolerância. Tal condição foi observada em experimento realizado em *Gossypium hirsutum* transgênico com tolerância ao herbicida inibidor da glutamina sintetase (Mahan *et al.*, 2006).

Por outro lado, as condições de temperatura de 25°C/16°C e 16°C/25°C simulam um efeito de “choque térmico” nas plantas, através da mudança brusca e extrema de temperatura, logo após a aplicação do herbicida nas plantas. A hipótese para explicar os resultados obtidos é que, de maneira geral, o choque térmico (estresse abiótico) desencadeia processos fisiológicos de defesa nas plantas, ocorrendo o aumento na expressão de genes ligados a produção de composto responsáveis por minimizar os efeitos do estresse (espécies reativas de oxigênio, por exemplo), como chaperonas, solutos compatíveis e proteínas de choque térmico (HSP) (Bowler *et al.* 199; Sheng-chun *et al.*, 2010). Este aumento na produção de metabólitos utilizados na tolerância da planta ao estresse acarreta em maior consumo energético e conseqüentemente maior demanda na produção de aminoácidos básicos pela planta, aumentando a atividade e expressão da enzima ALS. Estas respostas das plantas quando submetidas à exposição a mudanças bruscas de temperatura acarretam em alterações no teor de lipídios da membrana, aumento do nível de proteínas solúveis e açúcares além de mudanças na expressão de vários genes relacionados ao processamento de proteínas, cascatas redox, fotossíntese e síntese do nitrogênio (Timperio *et al.*, 2008).

As alterações metabólicas que ocorrem nas plantas submetidas a estas condições de choque térmico (25°C/16°C e 16°C/25°C) são desencadeadas muito rapidamente, podendo demonstrar efeitos na interação com o herbicida aplicado em um curto período de tempo. Estes resultados corroboram com o estudo realizado em *Amaranthus palmeri*, onde a temperatura durante o período de uma hora após a aplicação de piritiobac demonstrou ser um forte determinante da eficácia do herbicida sobre esta planta (Light *et al.*, 1999). Da mesma forma, os extremos de temperatura utilizados no experimento podem

representar respostas distintas dependendo das faixas de temperatura em que as plantas se encontram no período anterior e posterior a aplicação do herbicida. O herbicida sulfossulfurom (MON 37500- inibidor da ALS seletivo para *Triticum aestivum*), quando aplicado em dois intervalos de temperatura (5/10°C e 7/21°C) apresentou maior efeito fitotóxico no intervalo de temperatura mais elevado (7/21°C), independentemente da dose utilizada (Geier *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2000).

O metabolismo dos herbicidas inibidores da ALS em plantas é dependente da temperatura. Isto foi observado em tratamento de chorsulfuron em trigo (*Triticum aestivum*) onde em condições de ampla variação de temperatura diurna, ou baixas temperaturas de pós-tratamento retardaram o metabolismo e aumentaram o potencial para lesões no trigo (Ferreira *et al.*, 1990), ou seja, a diminuição da temperatura do ar e a presença de extremos de temperaturas após o tratamento diminuiu a detoxificação do herbicida nas plantas, aumentando o risco de lesões até mesmo para espécies tolerantes.

Através dos resultados obtidos, observa-se a necessidade de um maior aprofundamento dos estudos relacionados a atividade fisiológica da planta quando expostas a aplicação de herbicida associada com condições de temperaturas utilizadas no presente estudo. Análises da atividade e expressão de enzimas e/ou genes relacionados aos processos metabólicos de detoxificação de herbicidas ou mesmo relacionadas a tolerância a estresses abióticos podem oferecer respostas sobre quais processos fisiogenéticos estão envolvidos na resposta de capim-arroz quando expostas a aplicação do herbicida imazethapyr associado a diferentes condições de temperaturas.

4.4 CONCLUSÕES

As condições de temperatura em que as plantas foram submetidas no período pré e pós-aplicação do herbicida interferiram no nível de tolerância do capim-arroz resistente e suscetível ao herbicida imazethapyr. Condições de 16°C/16°C aumentam a tolerância de capim-arroz ao herbicida imazethapyr enquanto variações de temperatura que simulam um choque térmico

(16°C/25°C e 25°C/16°C) diminuem a tolerância destas plantas, aumentando sua sensibilidade a este herbicida.

O efeito da temperatura na alteração da sensibilidade do biótipo de capim-arroz resistente por incremento de metabolização pelas enzimas citocromo P450 indicam forte relação da temperatura com este mecanismo de resistência no presente estudo.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORTOLY, E. D. **Avaliação do mecanismo de resistência a imazethapyr e relações filogenéticas de capim-arroz (*Echinochloa* spp.)**. Porto Alegre: UFRGS, 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia, PPG Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BOWLER C, *et al.* Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p.83-116, 1992.

BURKE, J. J.; OLIVER, M. J. Optimal thermal environments for plant metabolic processes. Light harvesting chlorophylla/b pigment-protein complex of photosystem II and seedling establishment in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Physiology**, v. 102, n.1, p. 295–302, 1993.

CAREY, V. F. *et al.* Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass. II. In vivo metabolism of the propanil molecule. **Pesticide Science**, v. 49, n. 4, p. 333–338, 1997.

DAS, M. *et al.* A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. **Plant Molecular Biology**, v. 72, n. 4, p. 545-556, 2010.

DÉLYE, C. *et al.* Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, V. 29, n. 11, p. 649-658, 2013.

FERREIRA, K. L. *et al.* Factors Influencing Winter Wheat (*Triticum aestivum*) Injury from Sulfonylurea Herbicides. **Weed Technology**, v. 4, n. 4, p. 724-730, 1990.

GE, X. *et al.* Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by 31PNMR. **Pest Management Science**, v. 67, n. 1, p. 1215-1221, 2011.

GEIER, P. W. *et al.* Environmental and Application Effects on MON 37500 Efficacy and Phytotoxicity. **Weed Science**, v. 47, n. 6, p. 736-739, 1999.

HALL, L. M. *et al.* Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance. In SB Powles, JAM Holtum, eds, *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. **CRC Press**, Boca Raton, FL, p. 243-261, 1994.

KREUZ, K. *et al.* Old enzymes for a new job. **Plant Physiology**, v. 111, p. 349-353, 1996.

LIGHT, G. G. *et al.* Thermal Dependence of Pyriithobac Efficacy in *Amaranthus Palmeri*. **Weed Science**, v. 47, n. 6, p. 644-650, 1999.

MAHAN, J. R. *et al.* Thermal dependence of bioengineered glufosinate tolerance in cotton. **Weed Science**, v. 54, n. 1, p. 1-5, 2006.

MAHAN, J. R. *et al.* Thermal dependence of enzyme function and inhibition; implications for, herbicide efficacy and tolerance. **Physiologia plantarum**, v. 120, n. 1, p. 187-195, 2004.

MAHAN, J. R. Thermal dependence of malate synthase activity and its relationship to the thermal dependence of seedling emergence. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 48, n. 1, p.4544-4549, 2000.

MATZENBACHER, F. O. **Caracterização e controle de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas e quinclorac em arroz irrigado**. Porto Alegre: Dissertação (Mestrado-Herbologia), Faculdade de Agronomia, PPG Fitotecnia, UFRGS, 2012.

MATZENBACHER, F. O. *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 3, p. 1044-1058, 2014.

MILNER, L. J. *et al.* The effect of temperature on glutathione S-Transferase activity and glutathione content in *Alopercurus myosuroides* (black grass) biotypes susceptible and resistant to herbicides. **Weed Research**, v. 47, n.1, p. 106-112, 2007.

OLSON, B. L. S. *et al.* Efficacy and Metabolism of MON 37500 in *Triticum aestivum* and Weedy Grass Species as Affected by Temperature and Soil Moisture. **Weed Science**, v. 48, n. 5, p. 541-548, 2000.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

RIETHMULLER-HAAGE *et al.* Are pre-spraying growing conditions a major determinant of herbicide efficacy?. **European Weed Research Society**, v. 47, n. 1, p. 415-424, 2007.

SCHULER, M. A. Plant cytochrome P450 monooxygenases. **Plant Physiol**, v. 112, n. 4, p. 1411-1419, 1996.

SHENG-CHUN, X. *et al.* Responses of Antioxidant Enzymes to Chilling Stress in Tobacco Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 11, p. 1594-1601, 2010.

SOSBAI. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil** / V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da cultura do arroz irrigado, 192p, 2014.

TAMIRU, M. *et al.* A cytochrome P450, OsDSS1, is involved in growth and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 88, n.1, p. 85-99, 2015.

TIMPERIO, A. M. *et al.* Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of proteomics**, v. 71, n. 1, p. 391-411, 2008.

TRANEL, P. J.; WRIGTH, T. R. Resistance of Weeds to ALS-Inhibiting Herbicides: What Have We Learned ?. **Weed Science**, v. 50, n. 6, p. 700-712, 2002.

UPCHURCH, D. R. *et al.* Automating trickle-irrigation using continuous canopy temperature measurements. **Acta Horticulturae**, v.278, n. 1, p.299–308, 1990.

VAAHTERA, L.; BROSCHÉ, M. More than the sum of its parts--how to achieve a specific transcriptional response to abiotic stress. **Plant Science**, V. 180, n. 3, p. 421-430, 2011.

VIDAL, R. A.; MEROTTO JR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, v., 152p, 2001.

VILA-AIUB, MARTIN. *et al.* Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. **Pest Management Science**. v. 69, p. 228-232, 2012.

VIVANCOS, P. D. *et al.* Perturbations of Amino Acid Metabolism Associated with Glyphosate-Dependent Inhibition of Shikimic Acid Metabolism Affect Cellular Redox Homeostasis and Alter the Abundance of Proteins Involved in Photosynthesis and Photorespiration. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 256-268, 2011.

WILLINGHAM S.D. *et al.* Effect of temperature and propanil on penoxsulam efficacy, absorption, and translocation in alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*). **Weed Science**, v. 56, n. 6, p. 780-784, 2008.

YU, Q.; POWLES, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1340-1350, 2014.

YUAN, J. S. *et al.* Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

Capítulo 5 - EFEITO DA TEMPERATURA E INTERAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO NO CONTROLE DE BUVA RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLYPHOSATE

RESUMO

A buva (*Conyza bonariensis*) é uma das principais plantas daninhas no mundo, apresentando resistência a vários herbicidas, dentre eles o glyphosate. A temperatura pode influenciar a tolerância de alguns biótipos de buva ao herbicida glyphosate, reduzindo a translocação do herbicida através do sequestro no vacúolo. O objetivo do trabalho foi determinar o efeito da baixa temperatura em interação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) na resistência de buva (*Conyza bonariensis*) ao herbicida glyphosate. O estudo foi realizado em casa-de-vegetação e em câmara de crescimento. O fator A constou de um biótipo suscetível e um resistente ao herbicida glyphosate. O fator B do herbicida glyphosate em seis doses, de zero a 2880 g ha⁻¹ para ambos os biótipos. O fator C foi composto de duas condições de temperatura (12°C e 25°C) em que as plantas foram submetidas antes e após a aplicação do herbicida. O fator D constou da presença ou não de (NH₄)₂SO₄ na calda de aplicação com o glyphosate. As avaliações visuais de fitotoxicidade foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após o tratamento (DAT) e a massa seca da parte aérea aos 21 DAT. A associação de sulfato de amônio com glyphosate na calda de aplicação promove o aumento da fitotoxicidade do herbicida nas plantas de buva a 25°C, sendo que este efeito não se reflete na redução da massa seca da parte aérea das plantas. A temperatura de 12°C reduz o nível de resistência da buva ao herbicida glyphosate, resultando em aumento superior a 80% na eficiência de controle das plantas aos 21DAT na menor dose do herbicida (180 g ha⁻¹). A temperatura possui grande influência no mecanismo de resistência ao herbicida glyphosate no biótipo de buva avaliado, sendo que em baixas temperaturas a resistência é revertida.

Chapter 5 - EFFECT OF TEMPERATURE AND INTERACTION WITH AMMONIUM SULFATE IN CONTROL HORSEWEED RESISTANCE HERBICIDE GLYPHOSATE

ABSTRACT

Horseweed (*Conyza bonariensis*) is a major weed in the world, presenting resistance to various herbicides, including glyphosate. The temperature may influence tolerance of some biotypes of horseweed to glyphosate herbicide, thereby reducing translocation of the herbicide through the sequestering in the vacuole. The objective was to determine the effect of low temperature on interaction with ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) in the resistance Horseweed (*Conyza bonariensis*) to glyphosate herbicide. The study was carried in greenhouse and growth chamber. O chamber factor A consisted of a susceptible biotype and resistant to the herbicide glyphosate. The B factor of glyphosate herbicide in six doses, from zero to 2880 g ha⁻¹ for both biotypes. The factor C was composed of two temperature conditions (12°C and 25°C) in which the plants were treated before and after application of the herbicide. The factor D consisted of the presence or absence of (NH₄)₂SO₄ in the spray liquid with the glyphosate. The visual injury evaluations were performed at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT) and dry mass of shoots at 21 DAT. The ammonium sulfate in combination with glyphosate application syrup promotes increased herbicide phytotoxicity in plant horseweed at 25°C, and this effect is not reflected in the reduction of the dry mass of the shoots. The temperature of 12°C horseweed reduces the level of resistance to glyphosate herbicide, resulting in increase of more than 80% of the plants in the control efficiency 21 DAT at the lowest dose of the herbicide (180 g ha⁻¹). The temperature has great influence on the mechanism of resistance to the herbicide glyphosate in biotype rated horseweed, and low temperature resistance is reversed.

5.1 INTRODUÇÃO

A buva (*Conyza* spp) se tornou uma das principais plantas daninhas das lavouras de soja do Brasil, sobretudo no Rio Grande do Sul, devido a dificuldade de controle e aparecimento de biótipos resistentes ao herbicida glyphosate (Vargas *et al.*, 2007; Lamego & Vidal, 2008; Wu & Walker, 2010). Esta espécie pode produzir entre 110.000 a 200.000 sementes por planta (Kissmann & Groth, 1999). O aumento da população de buva cresceu com a adoção do sistema de semeadura direta e a introdução da soja Roundup Ready™ (RR), a partir do final da década de 1990 (Christoffoleti *et al.*, 2008). Essa espécie se adaptou às condições de não-revolvimento do solo e permanente cobertura de material orgânico na sua superfície, que são as principais características do sistema de semeadura direta (Yamashita & Guimarães, 2011). Ainda, por ser uma espécie fotoblástica positiva, a permanência das sementes na superfície do solo favorece a sua germinação (Vidal *et al.*, 2007). A competição com esta infestante pode reduzir a produtividade da soja entre 10 a 40%, ou até mais, dependendo das condições (Adegas *et al.*, 2011). Infestações de *Conyza canadenses* na densidade de 150 plantas m⁻² reduziu em 83% a produtividade da soja em sistema de semeadura direta (Bruce & Kells, 1990).

A utilização do herbicida glyphosate consiste atualmente em uma das principais práticas de manejo de plantas daninhas no cultivo da soja geneticamente modificada, além de consistir em uma importante ferramenta para dessecação de plantas de cobertura no sistema plantio direto. No mundo foram registrados até o momento a ocorrência de resistência em plantas de buva ao herbicida glyphosate em 15 países, sendo que, principalmente em relação a outras espécies, a buva constitui uma das plantas daninhas com resistência ao glyphosate mais disseminada pelo mundo (HEAP, 2015). No

Brasil, existem diversos casos registrados de resistência de buva ao herbicida glyphosate, dificultando assim o manejo desta planta daninha no atual cenário de cultivo da soja (Vargas *et al.*, 2007; Lamego & Vidal, 2008). Inicialmente restrita ao Rio Grande do Sul, a buva se encontra amplamente distribuída no Paraná e, em menor frequência, no sul do Mato Grosso do Sul. Atualmente, cerca de quatro milhões de hectares estão infestados por esta planta daninha. Estima-se que 60% das áreas de lavoura do Rio Grande do Sul estejam infestadas com buva (Adegas, 2010). No Paraná, a infestação está em cerca de 40% da área (Christoffoleti, 2010).

Após a aplicação do glyphosate via foliar, sua toxicidade implica em um processo composto por várias etapas. O glyphosate deve atravessar as estruturas da cutícula da folha e as paredes das células da epiderme, apoplasto, e mesofilo antes de chegar ao floema para ser transportado aos tecidos (Bromilow *et al.*, 1990; Bromilow & Chamberlain, 2000). A restrição da chegada do glyphosate no citoplasma da célula da planta (e cloroplastos) por qualquer meio é, em si, um mecanismo que pode conferir resistência (Shaner, 2009; Ge *et al.*, 2013). A elucidação dos fatores-chave que regulam a entrega para o meio intracelular das folhas da planta constituem em um ponto crítico para o desenvolvimento de uma compreensão completa do mecanismo (s) de resistência ao glyphosate.

Os principais mecanismos de resistência aos herbicidas em plantas daninhas são: a redução da absorção do herbicida (De Prado *et al.*, 2005), limitação da translocação devido ao sequestro vacuolar (Ge *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010), aumento da metabolização do herbicida (de Prado *et al.*, 2005; Busi *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012), alteração na enzima alvo do herbicida (Powles e Yu, 2010) e a amplificação do gene (Gaines *et al.*, 2010). Dos mecanismos descritos, até o momento, apenas a absorção e a degradação metabólica não são considerados mecanismos que desempenham um papel significativo na resistência de buva ao glyphosate (González-Torralva *et al.*, 2012).

Devido a importância do glyphosate, diversos estudos foram realizados a fim de avaliar a contribuição de diferentes variáveis em sua eficácia, como dose, volume de calda, qualidade da água e atividade de adjuvantes (Jordan *et*

al., 1997; Ramos & Durigan, 1998; Pratt *et al.*, 2003; Ramsdale *et al.*, 2003; Gauvrit, 2003; Nurse *et al.*, 2008). A adição de fontes nitrogenadas, como adjuvantes à calda do herbicida, tem sido relacionada à redução de doses, ao antagonismo de cátions em água dura e à melhor absorção e translocação da molécula do glyphosate (Maschhoff *et al.*, 2000; Pratt *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2006).

No momento em que o herbicida é aplicado no meio sobre as plantas, o mesmo é exposto as mais variadas interações com o ambiente, que podem afetar sua eficácia de controle. Estes fatores podem ser bióticos ou abióticos, interagindo com a molécula herbicida desde o momento em que ela é aplicada sobre as plantas até sua chegada no local alvo dentro da planta. No momento em que estas variáveis afetam a eficácia dos herbicidas, o conhecimento destes fatores, assim como os processos desencadeados por eles apresenta vital importância para que se possam adotar estratégias que visem o aumento da eficiência dos herbicidas. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da baixa temperatura em interação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na resistência de buva (*Conyza bonariensis*) ao herbicida glyphosate.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em casa de vegetação climatizada e em câmara de crescimento no Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR) localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre – RS. O experimento foi realizado nos meses de julho a outubro de 2014 e constou da avaliação do efeito do herbicida glyphosate isolado e em mistura com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ aplicados em pós-emergência em buva (*Conyza bonariensis*) cultivada sob diferentes condições de temperaturas.

5.2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado corresponde a duas populações de buva (*Conyza bonariensis*), sendo uma população apresentando resistência ao

herbicida Glyphosate e outra suscetível. A população resistente é oriunda de Palmeira das Missões, RS e a população suscetível é originária de Santa Maria, RS.

A germinação das sementes foi realizada por meio da imersão das mesmas em água a uma temperatura de 10 °C por um período de quatro dias a fim de induzir a superação da dormência. Posterior a isto, as sementes suspensas em água foram depositadas em bandejas contendo solo peneirado e umedecidos a saturação de campo e mantidas a temperatura de 24 °C com fotoperíodo de 12/12 horas até estarem aptas para o transplante (duas folhas verdadeiras).

As plantas foram transplantadas em copos plásticos com capacidade de 250 mL (uma planta por copo) contendo solo Gleissolo Háplico Ta distrófico típico além de adubação com 500 kg.ha⁻¹ de N-P-K na fórmula 5-20-20, incorporada ao solo anterior ao transplante. As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada até que as plantas estivessem em condições de serem submetidas aos tratamentos. As condições ambientais no interior da casa de vegetação foram de 25°C ± 3°C de temperatura dia/noite e fotoperíodo de 14hr.

Quando as plantas de ambas as populações encontravam-se com aproximadamente 15 cm de altura realizou-se uma pré-seleção a fim de homogeneizar todas as plantas constituintes do experimento em relação a estatura e vigor. Posterior a isto, as mesmas foram submetidas aos respectivos tratamentos.

5.2.2. Condução do experimento

O experimento foi organizado em blocos completamente casualizados em esquema fatorial (6x2x2x2) com quatro repetições. O fator A foi formado pelas doses de 0, 180, 360, 720, 1440 e 2880 g ha⁻¹ do herbicida glyphosate (*Gliz 480 SL*, 408 g L⁻¹). O fator B constituiu-se de duas condições de temperatura em que as plantas foram submetidas após a aplicação dos tratamentos, sendo 12 °C ou 25 °C. O fator C foi composto pela ausência ou presença de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ aplicado na dose de 20 mg L⁻¹ O

fator D constituiu dois biótipos de buva, sendo um resistente e outro suscetível ao herbicida glyphosate.

As plantas de buva foram submetidas a um período prévio de aclimação às determinadas temperaturas do experimento anterior a aplicação dos tratamentos químicos, sendo que parte das plantas permaneceram durante oito dias a temperatura de $12\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ e a outra metade das plantas permaneceram pelo mesmo período de tempo a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3$. Isto foi realizado a fim de minimizar possíveis efeitos de “choque térmico” que as plantas apresentariam se fossem expostas a mudanças bruscas de temperatura logo após a aplicação dos tratamentos químicos.

Após o período de aclimação as plantas foram submetidas a aplicação das diferentes doses do herbicida glyphosate além na presença ou não de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A aplicação dos tratamentos foi realizada em câmara de aspersão de produtos químicos (Greenhouse Spray Chamber, model Generation III, Devries Manufacturing, Hollandale, MN), pressurizada com ar comprimido a pressão constante de $40\text{ lb}\cdot\text{pol}^{-2}$, bico Teejet® 8002 E, velocidade de deslocamento de $1,16\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, resultando em um volume de calda de $200\text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Após a aplicação as plantas foram mantidas em suas respectivas condições de temperatura (12 ou $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o final das avaliações.

5.2.3. Avaliação e análise de dados

As avaliações foram realizadas através da eficiência de controle analisado por meio de avaliação visual utilizando escala percentual onde zero corresponde a ausência de danos e a nota 100 % à morte da planta. A avaliação visual foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento (DAT), e a massa seca da parte aérea que foi avaliada aos 28 DAT. A parte aérea das plantas foi coletada e acondicionada em estufa com temperatura de 60°C com ventilação até atingir peso constante.

Os dados foram expressos em porcentagem da média da testemunha sem aplicação. Após, os dados foram analisados com relação à normalidade e homogeneidade de variância. Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) pelo teste F com nível de significância a 5% de probabilidade. A complementação da análise de variância foi feita pela análise de regressão

através da equação log-logística de quatro parâmetros. O modelo log-logístico, no qual se utilizam parâmetros ou sigmóide de três parâmetros, que são biologicamente significativos quando aplicados à resposta da planta ao herbicida é o mais apropriado na análise da maioria dos estudos de dose-resposta (Seefeldt *et al.*, 1998). Os dados foram ajustados para equação log-logística (Equação 1) ou sigmóide de três parâmetros (Equação 2), através do programa Sigma Plot versão 10.0:

$$Y = \frac{a}{1 + (X/X_{a50})^b} \quad \text{Equação 1}$$

onde: Y = variável dependente (controle ou MSPA); X = variável independente (dose herbicida (g ha⁻¹)); a = assíntota de máxima; b = declividade da curva; X_{a50} = dose herbicida (g ha⁻¹) responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima (a). Foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes, o valor de X₅₀, ou seja, o valor da dose responsável por reduzir 50% do controle (C₅₀), ou reduzir 50% a MSPA dos biótipos (GR₅₀).

$$Y = \frac{a}{1 + \exp^{-(X-X_{a50})/b}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: Y = variável dependente (controle ou MSPA); X = variável independente (dose herbicida (g ha⁻¹)); a = diferença entre as assíntotas de máxima e mínima; b = declividade da curva; X_{a50} = dose herbicida (g ha⁻¹) responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima (a). Foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes, o valor de X₅₀, ou seja, o valor da dose responsável por reduzir 50% do controle (C₅₀), ou reduzir 50% a MSPA dos biótipos (GR₅₀). O fator de resistência (FR) foi calculado através de C_{50R}/C_{50S}, GR_{50R}/GR_{50S}.

5.3. RESULTADOS E DISCUSÕES

A análise da variância demonstrou a significância dos fatores doses do herbicida, biótipo, temperatura e presença ou não de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Também foi observada interação significativa entre os fatores dose e temperatura para as variáveis MSPA e fitotoxicidade. O biótipo suscetível, quando avaliado aos 7 DAT, apresentou controle superior quando em baixa temperatura (12°C), ultrapassando 50% de controle quando utilizada apenas 25% da dose recomendada de glyphosate (180 g ha^{-1}) (Figura 1), refletindo-se no valor do C_{50} observado ($182,73$) (Tabela 5.1). Para o biótipo suscetível, interação significativa entre doses de glyphosate e presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pode ser observada apenas na temperatura de 25°C aos 7 DAT, a qual proporcionou maior eficiência de controle das plantas de buva quando o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi adicionado à calda de aplicação. Destaca-se que na temperatura de 25°C , o valor do C_{50} observado foi de $>2280 \text{ g ha}^{-1}$, evidenciando que em condições normais de temperatura, ainda não é possível observar controle satisfatório pelo herbicida glyphosate aos 7 DAT (Tabela 5.1).

Nas avaliações realizadas aos 14 DAT e 21 DAT os resultados de eficiência de controle observados demonstraram respostas semelhantes à avaliação aos 7 DAT (Tabela 5.1). Em ambas as avaliações os maiores valores de controle foram observados para a temperatura de 12°C , sendo o controle superior a 80% já na menor dose utilizada no experimento (180 g ha^{-1}) (Figuras 5.5 e 5.6). Nas avaliações de 14 e 21 DAT, a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para o biótipo suscetível não se mostrou eficiente no aumento da eficiência de controle das plantas de buva, independentemente das condições de temperatura avaliadas. Aos 14 DAT, comparando-se apenas o efeito da temperatura no controle das plantas de buva, a temperatura de 12°C proporcionou uma diminuição de 4,86 vezes a dose de glyphosate para obtenção do C_{50} (Tabela 5.1)

TABELA 5.1. Equações^{ab} utilizadas para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C₅₀) ou 50% de redução do crescimento (GR₅₀) das plantas do biótipo de buva suscetível ao herbicida glyphosate. Porto Alegre, 2015.

Tratamentos	a	b	Xa ₅₀	C ₅₀	R ^{2c}
7 DAT					
12°C	60,702	-2,646	102,045	182,73	0,99
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	62,076	-3,497	100,292	150,56	0,98
25°C	49,500	-0,960	393,393	>2880	0,98
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	58,591	-1,812	353,227	933,68	0,99
14 DAT					
12°C	95,516	-3,84	87,496	89,66	0,99
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	96,989	-4,796	80,779	81,83	1,00
25°C	121,354	-0,961	630,354	435,38	0,96
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	100,563	-1,625	341,437	339,09	0,93
21 DAT					
12°C	99,669	-5,214	105,969	106,10	1,00
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	99,809	-4,409	86,799	86,87	1,00
25°C	103,214	-1,144	225,44	213,49	0,98
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	101,142	-1,363	197,002	193,76	0,98
Tratamentos	a	b	Xa ₅₀	GR ₅₀	R ^{2b}
MSPA					
12°C	1,143	0,013	0,541	76,13	0,99
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	1,112	0,111	0,517	83,81	0,95
25°C	4,088	0,590	46,891	135,52	0,99
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	2,773	0,835	108,768	152,08	0,98

^a Equação sigmoidal logística $Y = a / (1 + (X/Xa_{50})^b)$. ($p < 0,0001$).

^b Equação polinomial inversa de primeira ordem $X = a / (50 - Xa_{50})$. ($p < 0,0001$).

^c Coeficiente de determinação.

A condição de temperatura normal (25°C) proporcionou, em ambas as avaliações (14 e 21 DAT) os menores resultados de controle para as plantas de buva suscetíveis, igualando-se a eficiência de controle da condição de 12°C apenas quando avaliada na maior dose utilizada no experimento (2880 g ha⁻¹), correspondendo a um aumento de 200% da dose recomendada do herbicida glyphosate (720 g ha⁻¹) (Figura 5.1).

Destaca-se que em baixa temperatura (12°C), não ocorreu interação entre os fatores dose, (NH₄)₂SO₄, e biótipo na última avaliação realizada (21 DAT) (Figura 5.1). Nessa condição, tanto plantas resistentes quanto plantas suscetíveis, apresentaram controle superior a 90%, a partir da menor dose testada de glyphosate (180 g.ha⁻¹). Porém, em 25°C, o incremento de doses e adição de (NH₄)₂SO₄, melhorou o controle tanto no biótipo suscetível quanto no resistente (Figura 5.1 e 5.2).

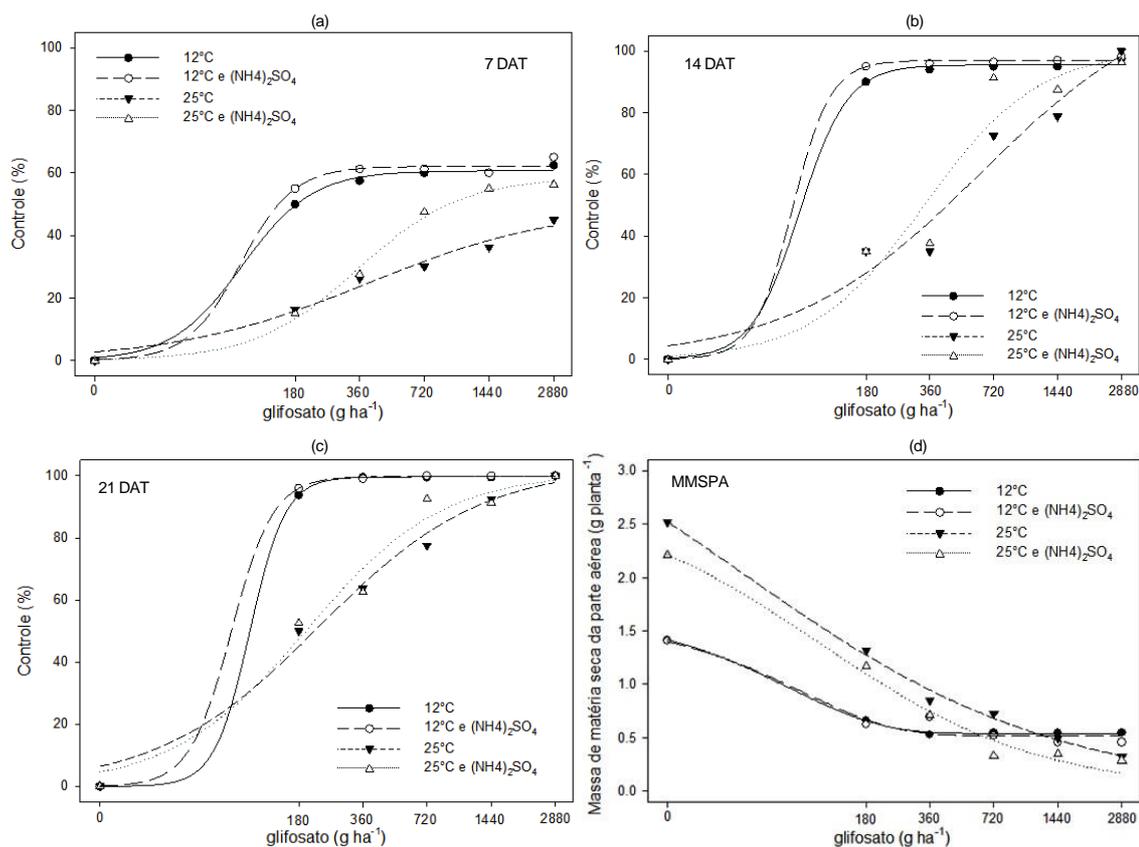


FIGURA 5.1. Controle de plantas de buva suscetíveis ao glyphosate aos 7 (a), 14 (b) e 21 (c) dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (d) em resposta à temperatura (12°C e 25°C) e à adição de (NH₄)₂SO₄ à calda de pulverização de glyphosate.

A avaliação de MSPA demonstra que, apesar das diferenças de crescimento das plantas entre as temperaturas avaliadas (12°C e 25°C), não observa-se grandes variações em termos de massa das plantas quando observadas dentro da mesma faixa de temperatura (Figura 5.1). Isto demonstra que o principal responsável pela redução da MSPA neste caso, é o fator temperatura e não a adição do (NH₄)₂SO₄. A maior redução da MSPA para o biótipo suscetível foi observada quando as plantas foram submetidas a temperatura de 12°C, apresentando redução superior a 50% na dose de 360 g ha⁻¹, o que pode ser observado também por meio da Figura 2 onde, como observado na avaliação visual de 21 DAT, a temperatura de 12°C proporcionou controle próximo a 100% já nas menores doses de glyphosate. O (NH₄)₂SO₄ não demonstrou efeito significativo na redução da MSPA independentemente das doses do herbicida e temperaturas avaliadas (Figura 5.1 e 5.2).

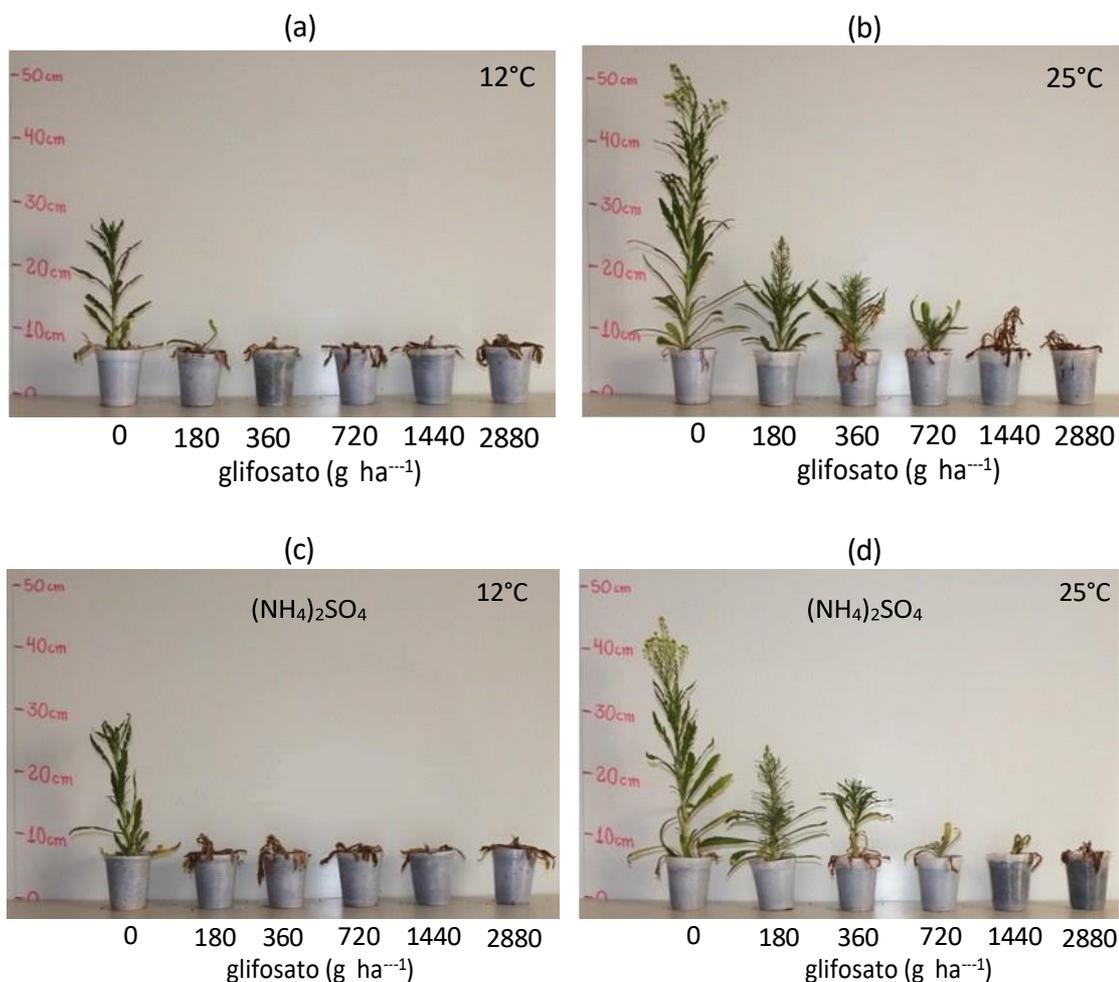


FIGURA 5.2. Plantas de buva suscetíveis ao glyphosate, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos, em resposta à temperatura de 12°C (a e c) e 25°C (b e d) e à adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (c e d) à calda de pulverização de glyphosate.

A avaliação visual de eficiência de controle realizada aos 7 DAT para o biótipo resistente indicou a ocorrência de sensibilidade diferenciada ao herbicida glyphosate, variando em função da temperatura avaliada e pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 3). A condição de baixa temperatura (12°C) proporcionou os melhores resultados de eficiência de controle, sendo que já na dose recomendada do herbicida (720 g ha^{-1}) o controle foi superior a 50%. Destaca-se também que dentro da temperatura de 12°C quando adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à calda de pulverização obteve-se controle superior ao observado quando utilizou-se glyphosate isoladamente, havendo incremento superior a 10% no nível de controle das plantas, alcançando controles acima de 60% nas maiores doses de glyphosate utilizadas (2880 g ha^{-1}).

Os menores resultados de controle aos 7 DAT foram observados em condições normais de temperatura (25°C), apresentando 40% de controle mesmo na maior dose de herbicida utilizada no experimento (Figura 5.3). O maior efeito do (NH₄)₂SO₄ foi observado na avaliação de 7 DAT para o biótipo resistente, onde em ambas as temperaturas avaliadas (12°C e 25°C) a adição de (NH₄)₂SO₄ proporcionou aumento do controle das plantas de buva nesta avaliação, principalmente das maiores doses avaliadas.

TABELA 5.2. Equações^{ab} utilizadas para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C₅₀) ou 50% de redução do crescimento (GR₅₀) das plantas do biótipo de buva resistente ao herbicida glyphosate. Porto Alegre, 2015.

Tratamentos	a	b	Xa ₅₀	C ₅₀	R ^{2c}	FR ^d
7 DAT						
12°C	45,180	-2,106	118,535	>2880,00	0,99	>15,76
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	68,481	-1,082	226,401	568,02	0,96	3,77
25°C	30,040	-0,970	286,106	>2880,00	0,96	>1,00
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	50,303	-0,899	683,602	>2880,00	0,94	>214,42
14 DAT						
12°C	97,527	-2,978	116,51	118,51	0,99	1,32
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	96,563	-3,625	103,875	105,94	0,99	1,29
25°C	111,253	-0,773	1549,872	1191,93	0,99	2,74
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	107,346	-0,944	899,53	777,95	0,99	2,29
21 DAT						
12°C	99,212	-3,635	91,022	91,42	1	0,86
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	99,248	-4,425	89,304	89,61	1	1,03
25°C	109,668	-0,971	1019,48	849,80	0,99	3,98
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	111,915	-0,966	869,736	697,10	0,99	3,60
Tratamentos	a	b	Xa ₅₀	GR ₅₀	R ^{2b}	FR ^c
MSPA						
12°C	1,750	0,011	1,558	82,21	0,96	1,08
12°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	2,170	0,006	2,170	127,82!	0,92	1,53
25°C	1,809	4,758	253,76	253,64	0,99	1,87
25°C + (NH ₄) ₂ SO ₄	1,789	2,854	322,15	322,15	0,99	2,12

^a Equação sigmoideal logística $Y = a / (1 + (X/Xa_{50})^b)$. ($p < 0,0001$).

^b Equação exponencial simples $Y = Xa_{50} + ae^{-bx}$. ($p < 0,0001$).

^c Coeficiente de determinação.

^d Fator de resistência = $C_{50}R/C_{50}S$.

Em condições de baixa temperatura (12°C), a partir de 360 g ha⁻¹ na avaliação aos 14 DAT e a partir de 180 g ha⁻¹ aos 21 DAT, o controle foi superior a 90%, sendo que nestas condições de elevado nível de controle,

provavelmente o fator temperatura se sobrepôs ao efeito da adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 5.3 e 5.4).

Nas avaliações de 14 e 21 DAT a condição de temperatura de 25°C mais a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na calda de pulverização não foi eficiente, proporcionando controle muito similar das plantas quando comparada ao herbicida glyphosate utilizado isoladamente nesta faixa de temperatura (Figuras 5.3).

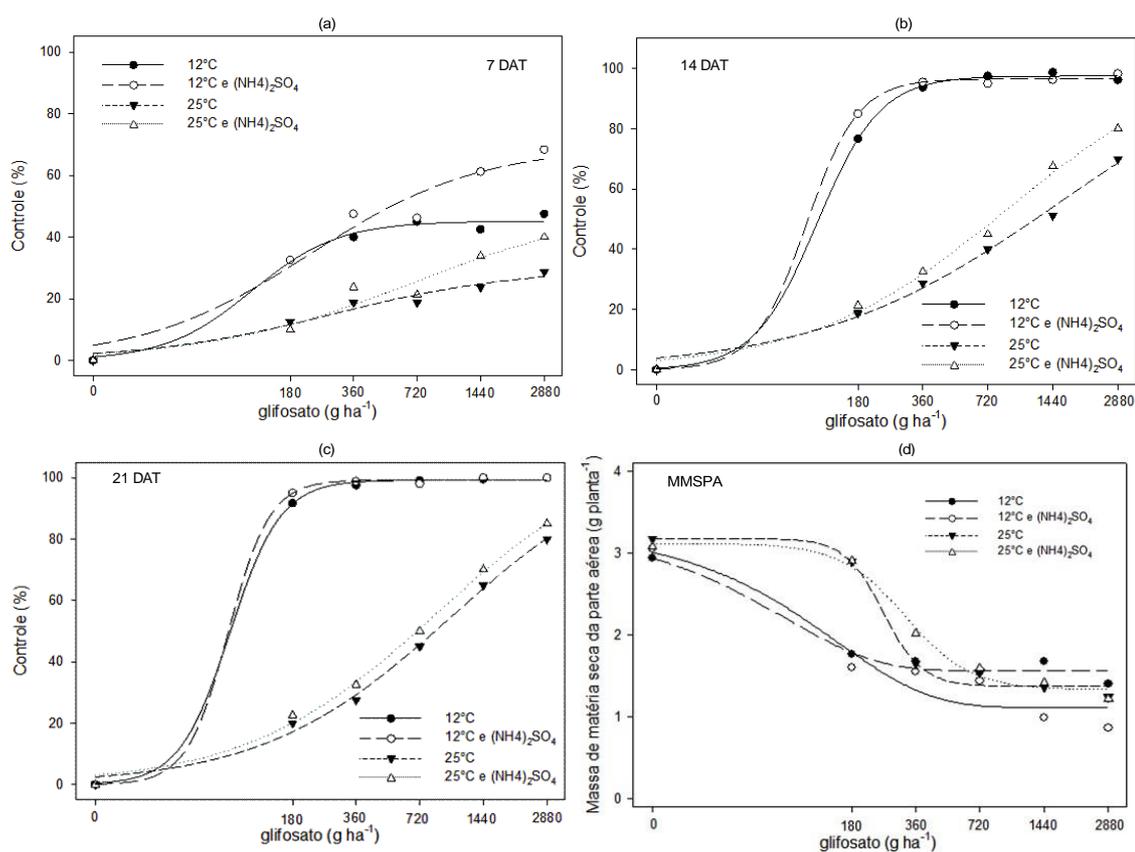


FIGURA 5.3. Controle de plantas de buva resistentes ao glyphosate aos 7 (a), 14 (b) e 21 (c) dias após a aplicação dos tratamentos e massa de matéria seca da parte aérea (d) em resposta à temperatura (12°C e 25°C) e à adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à calda de pulverização de glyphosate.

Destaca-se que em baixa temperatura, não observou-se interação entre os fatores dose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e biótipo na última avaliação realizada (21 DAT). Nessa condição, tanto plantas resistentes quanto plantas suscetíveis, apresentaram controle superior a 90%, a partir da menor dose testada de glyphosate (180 g ha^{-1}). O aumento do controle em função das diferentes temperaturas pode ser observado através dos valores de C_{50} , onde a temperatura de 12°C apresentou um C_{50} de 91,42, enquanto para 25°C este

valor subiu para 849,80, demonstrando a expressiva redução do nível de resistência do biótipo de buva resistente em função da temperatura avaliada (Tabela 5.2).

A avaliação da MSPA para o biótipo resistente demonstrou respostas similares das observadas para o biótipo suscetível quando compara-se apenas os fatores temperatura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 5.1 e 5.3). O biótipo resistente, na condição de 12°C , apresenta alta redução da MSPA já na primeira dose de glyphosate utilizada no experimento ($180 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$), não diferindo das demais doses testadas. Nesta condição, a interação dos fatores dose e temperatura, proporciona redução de MSPA, o que pode ser observado também pela redução do crescimento das plantas de buva (Figura 5.4).

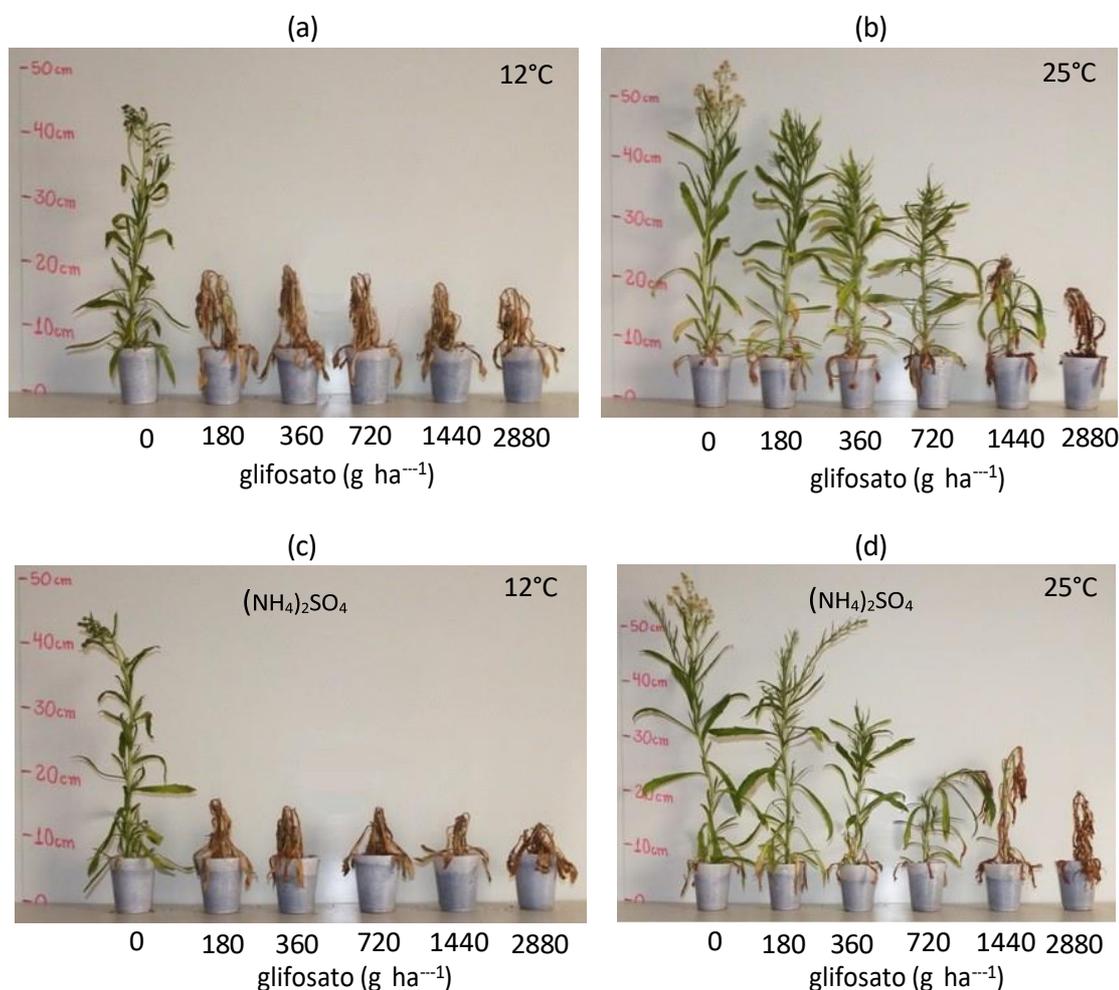


FIGURA 5.4. Plantas de buva resistentes ao glyphosate, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos, em resposta à temperatura de 12°C (a e c) e 25°C (b e d) e à adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (c e d) à calda de pulverização de glyphosate.

Os maiores efeitos do sulfato de amônio foram observados quando utilizou-se as maiores doses do herbicida e apenas aos 7 DAT. Nestas situações, a adição do composto nitrogenado apresentou resultados positivos no controle das plantas de buva. A adição de fontes nitrogenadas, como adjuvantes à calda do herbicida, tem sido relacionada à redução de doses, ao antagonismo de cátions em água dura e à melhor absorção e translocação da molécula do glyphosate (Costa & Appleby, 1986; Maschhoff *et al.*, 2000; Pratt *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2006). Em *Abutilon theophrasti* a concentração de 20 g L⁻¹ de sulfato de amônio proporcionou maior absorção e translocação de glyphosate e glufosinato (Maschhoff *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2003). Nesta concentração, observam-se também maior eficiência de controle de diferentes espécies de plantas daninhas, como *Sida spinosa* e *Ipomoea hederacea* var. *intergriuscula*, através da adição de (NH₄)₂SO₄ à calda do herbicida glyphosate (Pratt *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2006).

A MSPA, tanto para o biótipo resistente quanto para o suscetível, não apresentou efeito significativo no controle de plantas de buva por glyphosate através da adição do sal sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ a calda de aplicação. São comuns relatos sobre controle diferencial de espécies de plantas daninhas obtidos pelo glyphosate combinado a fertilizantes nitrogenados. Avaliando-se o controle de *Sorghum halepense* e *Brachiaria decumbens* por meio da aplicação de glyphosate e sulfato de amônio, observou-se que o uso do sulfato de amônio em mistura com glyphosate não elevou o controle de *B. decumbens*, no entanto, a menor dose do herbicida glyphosate resultou em maior eficácia sobre a comunidade mista de plantas daninhas e sobre *S. halepense* quando associado com o fertilizante nitrogenado (Carvalho *et al.*, 2012). Estes resultados demonstram que as respostas das plantas à adição do sulfato de amônio podem ser dependentes também do biótipo. No presente estudo, não ocorreram diferenças na redução da massa seca da parte aérea das plantas aos 21 DAT. No entanto, em muitos casos a adição do sulfato de amônio reduz a biomassa das plantas em consequência do aumento da eficiência do herbicida glyphosate. Em uma comunidade de plantas daninhas, por exemplo, a aplicação conjunta de glyphosate e (NH₄)₂SO₄ resultou em 93% de redução da biomassa das plantas, enquanto os tratamentos sem (NH₄)₂SO₄ reduziram a biomassa em 77% (Mahoney *et al.*, 2014).

O efeito da temperatura sobre a eficiência de controle do herbicida glyphosate, no entanto, foi relevante para o controle de buva no presente estudo, afetando significativamente o nível de tolerância das plantas ao herbicida glyphosate. Alterações de temperatura podem aumentar a concentração de antioxidantes nos tecidos da planta, tornando-os mais resistentes aos estresses subseqüentes (Foyer & Fletcher, 2001; Tausz, 2001; Tausz *et al.*, 2004). Estas respostas podem ser parte de um mecanismo natural de adaptação ao meio ambiente, levando a um aumento da plasticidade fisiológica da cultura, através de um rápido ajuste fenotípico, o qual confere vantagens consideráveis para plantas resistentes, permitindo-lhes sobreviver sob condições de estresse ambiental além de sobreviver ao tratamento por herbicidas (Milner *et al.*, 2007).

Em todas as avaliações a temperatura de 12°C proporcionou resultados superiores para as avaliações de fitotoxicidade e MSPA. Resultados semelhantes foram observados quando avaliou-se o controle de buva resistente ao herbicida glyphosate, onde o herbicida foi rapidamente sequestrado no vacúolo, não sendo observada esta resposta no biótipo suscetível (Ge *et al.*, 2010). Quando as plantas de buva foram aclimatadas e mantidas a temperatura baixa (10°C-12°C) o sequestro do herbicida no vacúolo não ocorreu, resultando na morte das plantas (Ge *et al.*, 2011).

A hipótese de que a limitação da translocação e posterior sequestro do glyphosate no vacúolo poderia ser o mecanismo de resistência principal foi reforçada por experimentos que mostraram o sequestro vacuolar de glyphosate correlacionada com a resistência das plantas ao herbicida em azevém (*Lolium* spp.) (Ge *et al.*, 2012). No entanto, estudos com ³¹P-NMR em *Amaranthus tuberculatus* e *Sorghum halepense* descrevem que a resistência nestas plantas está fortemente correlacionada com a falta de absorção de glyphosate na célula da planta (Ge *et al.*, 2013).

De acordo com as respostas observadas no presente estudo (sintomas, controle das plantas e efeito da temperatura), pode-se especular que o mecanismo de resistência dos biótipos de buva utilizados pode ser similar ao mecanismo descrito por Ge *et al.* (2012), onde ocorre redução da translocação do glyphosate através do sequestro no vacúolo das células. Destaca-se que até o momento, não haviam relatos deste mecanismo de resistência como

sendo o causador da resistência em populações de buva ao herbicida glyphosate no Brasil. Estes resultados ajudarão no diagnóstico da ocorrência da resistência nesta espécie, pois elimina o confundimento do efeito do momento da aplicação. Através destes resultados, é possível visualizar, um cenário preocupante da atual situação da resistência de buva no Brasil, com o surgimento cada vez maior de populações resistentes com variados mecanismos de resistência ao glyphosate.

5.4 CONCLUSÕES

A associação de sulfato de amônio com glyphosate na calda de aplicação incrementa a fitointoxicação das plantas de buva em baixas doses do herbicida, sendo que este efeito não se reflete na redução da massa seca da parte aérea das plantas.

A temperatura de 12°C reduz o nível de resistência da buva ao herbicida glyphosate, resultando em aumento superior a 80% na eficiência de controle das plantas aos 21DAT na menor dose do herbicida (180 g ha⁻¹).

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGAS, F. S. Buva precisa ser controlada ainda pequena. **Jornal Cocamar**. Disponível em: < <http://www.jornalcocamar.com.br/> >. Acesso em 06 de junho de 2010.

ADEGAS, F. S. *et al.* Manejo de buva resistente ao glyphosate. **Revista DBO Agrotecnologia**, n. 3, 2011.

BROMILOW, R. H. K. *et al.* Physico-chemical aspects of phloem translocation of herbicides. **Weed Science**, v. 38, n. 3, 1990.

BRUCE, J. A.; KELLS, J. J. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with pre-plant and pre-emergence herbicides. **WeedTechnology**, Champaign, v.4, n.3, p.642-647, 1990.

BUSI, R. *et al.* Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 106, n. 5, p. 817-824, 2011.

CARVALHO, L. B. *et al.* Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 615–622, 2012a.

CARVALHO, S. J. P. *et al.* Pulverização de glyphosate utilizando solução de uréia + sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.11, n.1, p.84-95, 2012b.

CHISTOFFOLETI, P. Alerta: Brasil tem 3,5 milhões de hectares infestados com buva. **Agronotícias**. Disponível em: <<http://www.sonoticias.com.br>>. Acesso em 06 de junho de 2010.

CHRISTOFFOLETI, P.J. *et al.* Glyphosate sustainability in South American cropping systems. **Pest Management Science**, v.64, p.422-427, 2008.

DE PRADO, J. L. *et al.* *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2185-2191, 2005.

GAINES, T. A. *et al.* Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **PNAS**, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GAUVRIT, C. Glyphosate response to calcium, ethoxylated amine surfactant, and ammonium sulfate. **Weed Technology**, v.17, n. 4, p.799-804, 2003.

GE, X. *et al.* Application of ³¹P-NMR Spectroscopy to Glyphosate Studies in Plants: Insights into Cellular Uptake and Vacuole Sequestration Correlated to Herbicide Resistance. **Nova Science**, v. 1, n. 1, p. 55-84, 2013.

GE, X. *et al.* Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, v.66, n. 4, p. 345-348, 2010.

GE, X. *et al.* Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ³¹P NMR. **Pest Management Science**, v. 67, n. 1, p. 1215-1221, 2011.

Ge, X. *et al.* Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a ³¹P NMR investigation. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 1243-1250, 2012.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F. *et al.* Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4361-4366, 2010.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F. *et al.* Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza Canadensis* L. Cronq) biotypes. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 17, p. 1673-1679, 2012.

HEAP, I. M. International Survey of Herbicide Resistant Weeds online. **Weed Science Society of America**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/>>. Acesso em 18 de junho de 2015.

JORDAN, D. L. *et al.* Influence of application variables on efficacy of glyphosate. **Weed Technology**, v.11,

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Bernardo do Campo: Basf., 1999.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *Conyzabonariensis* e *Conyza canadensis* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, v.26, n.2, p.467-471, 2008.

MAHONEY, K. J. *et al.* The effect of hard water, spray solution storage time, and ammonium sulfate on glyphosate efficacy and yield of glyphosate-resistant corn. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 8, p. 1401-1405, 2014.

MASCHHOFF, J. R. *et al.* Effect of ammonium sulfate on the efficacy, absorption, and translocation of glufosinate. **Weed Science**, v.48, n. 1, p.2-6, 2000.

MILNER, L. J. *et al.* The effect of temperature on glutathione S-transferase activity and glutathione content in *Alopecurus myosuroides* (black grass) biotypes susceptible and resistant to herbicides. **Weed Research**, v.47, n. 2, p.106-112, 2007.

MUELLER, T. C. *et al.* Comparison of glyphosate salts (isopropylamine, diammonium and potassium) and calcium and magnesium concentrations on the control of various weeds. **Weed Technology**, v.20, n. 1, p.164-171, 2006.

NURSE, R. E. *et al.* Annual weed control may be improved when AMS is added to below-label glyphosate doses in glyphosate-tolerant maize (*Zea mays* L.). **Crop Protection**, v.27, n. 3, p. 452-458, 2008.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

PRATT, D. *et al.* Substitutes for ammonium sulfate as additives with glyphosate and glufosinate. **Weed Technology**, v.17, n. 3, p.576-581, 2003.

RAMOS, H. H.; DURIGAN, J. C. Efeitos da qualidade da água de pulverização sobre a eficácia de herbicidas aplicados em pós-emergência. **Bragantia**, v.57, n. 2, p.313-324, 1998.

RAMSDALE, B.K. *et al.* Spray volume, formulation, ammonium sulfate, and nozzle effects on glyphosate efficacy. **Weed Technology**, v. 17, n. 3, p.589-598, 2003.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, v. 57, n. 1, p. 118-123, 2009.

VARGAS, L. *et al.* Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, n.3. 2007.

VIDAL, R. A. *et al.* Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**. v. 25, n. 2, p. 309-315, 2007.

WU, H.; WALKER, S. **Fleabane: fleabane biology and control**. 2004. Online. Disponível em: < <http://www.weeds.crc.org.au>>. Acesso em 26 de maio de 2010.

YAMASHITA, O. M.; GUIMARÃES, S. C. Biologia e resistência a herbicidas de espécies do gênero *Conyza*. **Ambiência**. v.7 n.2, p.383 – 398, 2011.

YOUNG, B.G. *et al.* Glyphosate translocation in common lambsquarters (*Chenopodium album*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) in response to ammonium sulfate. **Weed Science**, v.51, n. 2, p.151-156, 2003.

YU, Q. *et al.* Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemical Physiology**, v. 98, n. 1, p. 104-9, 2010.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O capim-arroz e a buva estão entre as principais plantas daninhas de culturas no Brasil e no Mundo. As características relacionadas a sua biologia e respostas aos herbicidas acarretaram no aumento de sua importância como planta daninha assim como o interesse na realização de estudos nestas plantas. Vários fatores influenciam a velocidade da evolução da resistência, incluindo fatores relacionados ao ambiente, aos herbicidas e fatores relacionados à genética e biologia das plantas daninhas, sendo que estes grandes responsáveis pela evolução e adaptação de plantas resistentes.

Em capim-arroz, fatores relacionados a biologia, como a prolificidade das plantas e dormência das sementes apresentam elevada relevância. Plantas de capim-arroz da espécie *Echinochloa crus-galli* apresentam alta intensidade e duração da dormência, principalmente logo após a maturação das sementes, apresentando sob condições normais sem tratamentos de superação de dormência, ausência completa de germinação de suas sementes até dois meses após a colheita. Além disso, as plantas desta espécie possuem alta prolificidade, chegando a produzir 23.107 sementes quando cultivadas a campo nas condições do Rio Grande do Sul. Estas características são importantes pois favorecem a perpetuação desta espécie na lavoura e contribuem notavelmente para a manutenção do banco de sementes do solo, que é a maior fonte de novas plantas na lavoura e ocasiona altas infestações nas áreas cultivadas com arroz irrigado (Avila *et al.*, 2005).

A ocorrência de variações genéticas capazes de ser transmitidas hereditariamente e a seleção natural favorecem a evolução da resistência aos herbicidas, sendo que as características relacionadas ao aparato reprodutivo, como sistema de fecundação das espécies apresentam relevância na dispersão do alelo de resistência entre plantas daninhas suscetíveis (Latta *et*

al., 1998). O fluxo de genes de resistência mediados por pólen possui grande influência nas variações genéticas dentro de uma população, na frequência de resistência múltipla ou poligênica a herbicidas, e na dinâmica evolutiva de uma espécie (Smith *et al.*, 2015). A espécie *E. crus-galli*, apesar de ser considerada uma espécie autógama, apresenta taxa de fecundação cruzada média de 3,46%, podendo chegar a 4,41% quando avaliada em condições de campo no Rio Grande do Sul, sendo esta uma taxa relativamente alta de fluxo de genes para outras plantas. Estes conhecimentos são importantes para o entendimento da dispersão e surgimento da resistência entre populações, além da elaboração de estratégias de prevenção e controle da resistência aos herbicidas plantas daninhas.

O conhecimento dos fatores que limitam o desempenho dos herbicidas permite selecionar os momentos mais apropriados para sua eficácia, otimizar a dose aplicada e reduzir o custo de produção. Dentre os diversos fatores que afetam a eficácia dos herbicidas, os fatores ambientais (abióticos), principalmente a temperatura, umidade do solo, do ar e luz, afetam a dinâmica do herbicida na planta em relação a sua absorção, translocação, metabolização e atividade no local de ação (Lambrev & Goltsev, 1999). A temperatura possui grande influência na tolerância de plantas de capim-arroz e buva resistentes aos herbicidas imidazolinonas e glyphosate. Plantas de capim-arroz resistentes a herbicidas ALS foram mais tolerantes ao herbicida quando submetidos a baixa temperatura (16°C/16°C), reduzindo assim seu controle pelo herbicida. Em contrapartida, quando estas plantas foram submetidas a condições que simulam um choque térmico (16°C/25°C e 25°C/16°C), o que pode ser observado foi a redução do nível de tolerância das plantas resistentes, resultando em maior controle das mesmas pelo herbicida. A temperatura possui grandes efeitos na tolerância de buva resistente ao herbicida glyphosate, sendo que temperatura de 12°C revertem a resistência destas plantas, mesmo em baixas doses do herbicida, demonstrando grande efeito da temperatura no mecanismo de resistência destas plantas.

O entendimento das características relacionadas a genética, fisiologia e biologia de plantas daninhas, assim como a interação de fatores ambientais com o mecanismo de resistência destas plantas aos herbicidas apresentam grande relevância para o estudo da resistência de plantas daninhas aos

herbicidas. Estes resultados contribuem de forma direta para o entendimento dos processos relacionados com a evolução e a dispersão da resistência de plantas daninhas nos sistemas agrícolas. Também serve como base para o aprofundamento de estudos relacionados com a biologia e a evolução da resistência de capim-arroz, assim como, na obtenção de respostas das plantas de capim-arroz e buva resistentes a herbicidas a estresses ambientais.

6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILA, L. A. *et al.* Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp.) and imidazolinone tolerant/resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management. Science**, v. 61, n. 2, p. 171-178, 2005.

Barry, 2011

LAMBREV, P.; GOLTSEV, V. Temperature affects herbicide-sensitivity of pea plants. **Bulgar. Journal Plant Physiology**, v. 25, n. 3, p. 54-66, 1999.

SMITH, C. *et al.* Experimental Methods to Study Gene Flow. **Weed Science**, v. 63, n. 1, p. 12-22, 2015.