

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Detecção da resistência de *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. e *Oryza sativa* a herbicidas inibidores da ALS pelo método de cultivo in vitro

Daniela Tessaro

DANIELA TESSARO

Detecção da resistência de *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. e *Oryza sativa* a herbicidas inibidores da ALS pelo método de cultivo in vitro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Herbologia).

Orientador: Dr. Dirceu Agostinetto

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T338d Tessaro, Daniela

Detecção da resistência de bidens pilosa, echinochloa sp. e oryza sativa a herbicidas inibidores da als pelo método de cultivo in vitro / Daniela Tessaro ; Dirceu Agostinetto, orientador. — Pelotas, 2018.

73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Resistência. 2. Planta daninha. 3. Herbicida. 4. Teste de resistência. 5. Meio de cultura. I. Agostinetto, Dirceu, orient. II. Título.

CDD : 632

Banca examinadora:

Eng. Agr. Dr. André da Rosa Ulguim

Eng. Agr. Dr^a. Elisa Lemes

Bióloga. Dr^a. Juliana Aparecida Fernando

Eng. Agr. Dr. Dirceu Agostinetto
(Orientador)

Aos meus pais Altair e Odete;
Ao meu namorado Yuri.

OFEREÇO E DEDICO

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, pela força, coragem e perseverança para trilhar este caminho.

Aos meus pais e toda minha família que, com muito apoio e mesmo com a distância, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu namorado Yuri Rocha França que sempre esteve presente em todos os momentos dando suporte e apoio, pelo amor, companheirismo, confiança e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade pela oportunidade de realização do curso e aos professores que contribuíram para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Professor Dirceu Agostinetti, pela disponibilidade que sempre manifestou em ajudar-me, pelo acompanhamento nos experimentos, pelas ideias, ensinamentos e orientação.

Aos professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelo apoio e incentivo na etapa inicial desta pesquisa, bem como nas disciplinas cursadas no programa.

Ao professor Dr. André da Rosa Ulguim, a Dra. Daiane de Pinho Benneman e Dra. Elisa Lemes por toda assistência, apoio e paciência em diversas etapas dos experimentos com cultura de tecidos.

A todos os colegas e amigos do Ceherb, em especial Lais Tessari Perboni, Jessica Rodrigues Garcia e Edna de Almeida Souza pelo companheirismo, incentivo, auxílio na execução dos trabalhos, pelos momentos de apoio e amizade

ao longo de muitos anos de convivência na FAEM e no CEHERB. Também agradeço aos colegas e amigos Andres Monge, Claudia de Oliveira, Francisco Goulart, Jonas Henckes, Joanei Cechin, Juliano Gazola, Maicon Schmitz, Queli Ruchel e Renan Zandoná pelos momentos de convívio, auxílio e acompanhamento na execução de experimentos, disciplinas e demais atividades ao longo do mestrado.

Aos estagiários e bolsistas: João Goëebel, Jonathan Torchelsen, José Vitor da Silva, Kevin Kickhofel Weissshahn, Marlon Teixeira, Roberto Avila Neto e Sílvio Thiago Raphaelli.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

TESSARO, Daniela. **Detecção da resistência de *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. e *Oryza sativa* a inibidores da ALS pelo método de cultivo in vitro.** 2018. 73f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é problema que tem sido cada vez mais estudado, devido a sua grande importância na agricultura e ao rápido crescimento deste fenômeno no mundo inteiro. A detecção de biótipos resistentes de forma rápida é de extrema importância para o manejo da resistência. A comprovação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas pode ser feita através de ensaios de campo, casa-de-vegetação e laboratório. Uma forma rápida de detecção da resistência é através do cultivo in vitro, onde é possível utilizar clones da planta mãe resistente e obter resultados em poucos dias. Os objetivos da pesquisa foram: determinar a resistência de *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. e *Oryza sativa* a herbicidas inibidores da ALS, através do cultivo in vitro com adição de herbicidas; determinar a concentração dos herbicidas imazetapir e imazapir+imazapique necessária para 95% de controle da população dos biótipos suscetíveis; avaliar o crescimento de explantes; e, determinar a concentração de herbicida adicionada ao meio de cultura em que é possível distinguir planta resistente de suscetível. Para isso foram conduzidos experimentos em casa de vegetação e laboratório de cultura de tecidos. Foi realizada detecção de biótipos resistentes e suscetíveis de cada espécie, testes para o estabelecimento das espécies e curvas de dose resposta in vitro. As concentrações de herbicida adicionadas ao meio de cultura que proporcionaram controle de 95% dos biótipos suscetíveis e que discriminaram com eficiência os biótipos suscetíveis dos resistentes foram 0,6 μM de imazetapir para *B. pilosa*, 0,9 e 1,3 μM de imazapir+imazapique para *Echinochloa* sp e *O. sativa*, respectivamente. A validação deste método auxilia nas recomendações de manejo e na tomada de decisão de forma rápida para o controle destas plantas daninhas, evitando assim, maiores danos às culturas.

Palavras-chave: Teste de resistência; meio de cultura; picão-preto, capim-arroz; arroz daninho.

Abstract

TESSARO, Daniela. **Resistance detection of *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. and *Oriza sativa* to ALS inhibitors by in vitro plant growth method.** 2018. 73f. Master of Plant Protection – Plant Protection Graduate Program. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The resistance of weeds to herbicides is a problem that has been increasingly studied because of its great importance in agriculture and rapid growth of this phenomenon worldwide. The quick detection of resistant plants is extremely important for resistance management. Weed resistance to herbicides can be detected through field, greenhouse and laboratory tests. A quick way of detecting resistance is using tissue culture method, where is possible to use resistant plant clones and obtain results faster than whole-plant method in greenhouse. The goals of the research were: to detect the resistance of blackjack, barnyardgrass and weedy rice to ALS inhibitors by herbicide addition in vitro cultivation; determine the herbicide concentration of imazethapyr and imazapyr+imazapic to 95% control of the susceptible plants population; evaluate explants growth; and, determine the herbicide concentration added to the culture medium where is possible to distinguish a resistant from a susceptible plant. Experiments were carried out in greenhouse and tissue culture laboratory. Screening was performed to select resistant and susceptible biotypes of each species, tests for species establishment and dose response curves in vitro were made. The herbicide concentrations added to the culture medium that provided 95% susceptible biotypes control and efficiently differentiated susceptible biotypes from resistant ones were 0.6 μ M of imazethapyr for *B. pilosa*, 0.9 and 1.3 μ M of imazapyr+imazapic for *Echinochloa* sp. and *O. sativa*, respectively. The validation of this method helps recommendations of weed management and provides a quick decision to alternative control of these species, thus avoiding major damage to the crops.

Key words: Resistance test; culture medium; blackjack; barnyardgrass; weedy rice.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Segmentos nodais de *B. pilosa* de acordo com escala adotada para avaliação de crescimento: 0; 50 e 100%. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....23
- Figura 2 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível ao imazetapir, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (D) aos 21 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.... 29
- Figura 3 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível ao imazetapir, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (D) aos 21 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....30
- Figura 4 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazetapir, em diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e aos 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e crescimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....31
- Figura 5 - Explantes de *Echinochloa* sp. de acordo com escala adotada para avaliação de crescimento: 0; 50 e 100%. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.41

- Figura 6 - Controle visual (%) de explantes de capim-arroz suscetível ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2018.48
- Figura 7 - Controle visual (%) de explantes de capim-arroz suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e crescimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2018..... 49
- Figura 8 - Controle visual (%) de explantes de arroz daninho suscetível ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2018.....60
- Figura 9 - Controle visual (%) de explantes de arroz daninho suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e crescimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2018.....61

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Localização geográfica e resposta de biótipos de picão-preto à aplicação de imazetapir aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.26
- Tabela 2 - Comprimento de explantes de picão-preto avaliados aos 14 dias após inoculação no meio de cultura. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2016.27
- Tabela 3 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazetapir em diferentes concentrações do herbicida aos 5 e 10 DAI e crescimento da parte aérea dos explantes aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.34
- Tabela 4 - Localização geográfica e resposta de biótipos de capim-arroz à aplicação de imazapir+imazapique aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.44
- Tabela 5 - Porcentagem de crescimento e comprimento da raiz de explantes de capim-arroz avaliado visualmente aos 14 dias após inoculação no meio de cultura. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2016.45
- Tabela 6 - Controle visual (%) de explantes de capim-arroz suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique em diferentes concentrações do herbicida aos 5 e 10 DAI e crescimento da parte aérea dos explantes aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2018.51
- Tabela 7 - Localização geográfica e resposta de biótipos de arroz daninho à aplicação de imazapir+imazapique aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.58

Tabela 8 - Controle visual (%) de explantes de arroz daninho suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique em diferentes concentrações do herbicida aos 5 e 10 DAI e crescimento da parte aérea dos explantes aos 10 DAI. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2018.63

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 CAPÍTULO I - Detecção de biótipo de picão-preto resistente a herbicida inibidor da ALS pelo método de cultivo in vitro	19
2.1 Introdução.....	19
2.2 Material e Métodos	21
2.3 Resultados e Discussão	25
2.4 Conclusões	36
3 CAPÍTULO II - Detecção de biótipo de capim-arroz resistente a herbicida inibidor da ALS pelo método de cultivo in vitro	37
3.1 Introdução.....	37
3.2 Material e Métodos	39
3.3 Resultados e Discussão	43
3.4 Conclusões	53
4 CAPÍTULO III – Detecção de biótipo de arroz daninho resistente a herbicida inibidor da ALS pelo método de cultivo in vitro	54
4.1 Introdução.....	54
4.2 Material e Métodos	56
4.3 Resultados e Discussão	58
4.4 Conclusões	65
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS.....	67
VITA.....	73

1 INTRODUÇÃO

O manejo das plantas daninhas é uma prática indispensável nos sistemas de produção agrícola que buscam manter produtividades elevadas, sendo o controle químico com herbicidas a tecnologia mais utilizada. O uso de herbicidas é atribuído principalmente à eficiência, uniformidade, praticidade, amplo espectro de ação, possibilidade de controle em áreas extensas e baixo custo, quando comparado a outros métodos de controle (GAZZIERO et al., 2009). Contudo sua utilização deve ser integrada a outros métodos, para evitar a seleção de espécies daninhas resistentes (VARGAS et al., 2011).

As plantas daninhas apresentam ampla variabilidade genética, que permite sua adaptação ao método utilizado para seu manejo. A diversidade genética é importante no desenvolvimento da resistência, pois algumas espécies possuem alta taxa natural de mutações conferindo resistência a uma classe de herbicidas antes mesmo deste ser aplicado a campo. Muitas vezes, a característica de resistência pode ser disseminada através do pólen e das sementes, aumentando assim o fluxo gênico que confere resistência para áreas adjacentes (MONQUERO et al., 2000).

A biologia da planta daninha também influencia na evolução da resistência, como é o caso das plantas daninhas de ciclo anual, as quais apresentam maior número de gerações no tempo. Conseqüentemente, pode ocorrer maior variabilidade genética na população, aumentando as chances da presença de biótipos resistentes e seleção destes pelo uso frequente de mesmo agente selecionador.

A resistência é decorrente da pressão de seleção imposta pelos herbicidas, sendo influenciada por vários fatores, entre os quais aqueles ligados ao produto, como alta especificidade, período residual no solo prolongado e utilização intensiva

do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, que selecionam mais rapidamente os biótipos de plantas daninhas resistentes em diversas culturas (MONQUERO et al., 2000). Exemplos disto são as espécies resistentes aos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), como capim-arroz (*Echinochloa* sp.) e o arroz daninho (*Oryza sativa*) presentes nas áreas orizícolas e picão-preto (*Bidens pilosa*) em culturas de sequeiro. A ocorrência desses biótipos se torna um grande problema tamanha a dificuldade de controle que a resistência impõe.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é a capacidade natural e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie. Por sua vez, a suscetibilidade da planta daninha ao herbicida é definida como o grau de injúria ou morte da planta que é observado após a aplicação do produto, sendo esta característica inata de cada espécie (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2016).

O primeiro relato de resistência a herbicida registrado foi no ano de 1952, no Canadá para *Daucus carota* ao 2,4-D, seguida de *Commelina difusa* em 1957, nos Estados Unidos, resistente ao mesmo herbicida. O uso continuado de herbicidas aumentou o número de espécies resistentes no mundo, sendo que atualmente existem relatos de 485 biótipos, pertencentes a 252 espécies, das quais 146 são eudicotiledôneas e 106 são monocotiledôneas (HEAP, 2018).

Para inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), o primeiro caso de resistência registrado foi *Lolium rigidum*, no ano de 1982, na Austrália e, atualmente há registro de 159 espécies resistentes a este mecanismo de ação. No Brasil, os primeiros casos de resistência a ALS ocorreram no ano de 1993, para as espécies picão-preto e leiteira (*Euphorbia heterophylla*) (HEAP, 2018).

O picão-preto é uma planta daninha eudicotiledônea da família *Asteraceae*, presente nas culturas da soja e milho, e uma das primeiras espécies relatadas com resistência a herbicidas inibidores da ALS no Brasil (HEAP, 2018). Recentemente, foram registrados no Estado do Paraná biótipos de picão-preto com resistência múltipla a ALS e fotossistema II (FSII), resistentes principalmente à imazetapir e atrazina, podendo ser resistentes a outros herbicidas dos mesmos grupos (HEAP, 2018).

Neste cenário de resistência de plantas daninhas a ALS no Brasil, destacam-se também o capim-arroz e o arroz daninho. Estas plantas são consideradas as mais importantes infestantes da lavoura do arroz por pertencerem à mesma família botânica da cultura (ANDRES et al., 2007), por possuírem boa adaptação a solos alagado e, no caso do capim-arroz, via fotossintética C4 e rápido crescimento (KISSMANN, 2007), o que dificulta seu controle.

O controle destas espécies por muito tempo foi e tem sido feito pela utilização de herbicidas inibidores da ALS, como imazapir+imazapique. Estes herbicidas apresentam alta especificidade entre herbicida e enzima alvo, característica que favorece a seleção de plantas daninhas resistentes (HEAP, 2018).

Além da utilização intensiva e repetida do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, outros fatores, como a capacidade de sobrevivência, a fecundidade e a habilidade competitiva, também favorecem a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes (MAXWELL; ROUSH; RADOSEVICH, 1990). Dessa forma, algumas plantas apresentam maior ou menor potencial de perpetuação da espécie e disseminação da resistência.

A presença de biótipos resistentes é decorrente de diferentes mecanismos de resistência, que envolvem a alteração ou não do local de ação do herbicida (POWLES; PRESTON, 2006; POWLES; YU, 2010). O mecanismo de resistência por alteração do local de ação é originado pela deleção ou adição de bases ou também troca de um ou mais aminoácidos na enzima alvo, que impede o correto acoplamento do herbicida, ou ainda, superexpressão da enzima alvo, que resulta em elevado número de enzimas e incapacidade do bloqueio pelo herbicida (POWLES; YU, 2010).

Por outro lado, na resistência não relacionada ao local alvo, não há alterações significativas na sequência proteica ou nível de expressão da proteína. Pode-se dizer que, teoricamente, a resistência não relacionada ao local alvo poderia minimizar a quantidade de herbicida atingindo o local alvo, que pode ocorrer pela diminuição da absorção foliar ou translocação fora das seções tratadas, pelo aumento do sequestro e/ou metabolismo do herbicida (YUAN et al., 2007).

Dentre as medidas preconizadas para o manejo da resistência é essencial o monitoramento constante da lavoura, para identificar possíveis focos, sendo que as plantas suspeitas devem ser eliminadas (LAZAROTO; FLECK; VIDAL, 2008). Na

ausência de novos herbicidas com diferentes modos de ação e com a eliminação progressiva de alguns ingredientes ativos, torna-se de grande importância detectar e manejar a resistência no campo o mais rapidamente possível (RUEEGG et al., 2007).

A comprovação científica da resistência de populações de plantas daninhas aos herbicidas pode ser feita através de ensaios de campo, casa de vegetação e laboratório. Na literatura encontram-se casos de detecção de resistência confirmados através do método de curvas de dose resposta, representadas por modelos não lineares, log-logísticos, que utilizam parâmetros que são biologicamente significativos quando aplicados à resposta de plantas à herbicidas (SEEFELDT et al., 1995). Entretanto, as curvas de dose resposta conduzidas em casa de vegetação, são experimentos que podem levar até 28 dias para a confirmação da resistência após a aplicação do produto, dependendo do mecanismo de ação do herbicida e, se considerarmos o tempo desde a verificação do escape a campo, obtenção das sementes, superação de dormência e os resultados do teste, este pode chegar a 150 dias. Ainda, como o material vegetal testado é proveniente de sementes, além de levar mais tempo para a realização do teste, podem existir indivíduos com características de resistência bem distintas, mesmo sendo da mesma planta mãe, em função da segregação que ocorre na reprodução sexuada.

Alternativamente, testes de laboratório, mais rápidos e sofisticados, foram desenvolvidos baseados na atividade de enzimas (READE; COBB, 2002; YANG et al., 2007; MARSHALL; MOSS, 2008) e no DNA (DELYE et al., 2002; KAUNDUN; WINDASS, 2006; DELYE et al., 2009), especialmente quando o mecanismo de resistência é conhecido. No entanto, o teste que utiliza a planta inteira continua sendo o método mais comumente empregado para confirmação da resistência.

Em 2011, foi desenvolvido teste rápido de resistência Resistance in-season quick (RISQ) para detectar a resistência em monocotiledôneas aos herbicidas inibidores da acetil-CoA carboxilase (ACCCase) e ALS, o qual baseia-se no cultivo de plântulas em solução de ágar com adição de diferentes concentrações de herbicida (KAUNDUN et al., 2011). Este método tem a vantagem de detectar a resistência de forma rápida comparativamente à casa de vegetação. Atualmente, o método tem sido testado para outras espécies e com diferentes herbicidas, porém ainda tem a limitação de utilizar material proveniente de sementes.

Uma forma ainda mais rápida de conduzir o teste é através de explantes de plantas adultas em vez de utilizar plântulas, como é feito no “RISQ”. Utilizando a cultura de tecidos é possível cultivar os explantes produzindo clones da planta mãe e, desta forma, excluir qualquer chance de variabilidade genética gerada quando a planta se reproduz por semente, além de não precisar aguardar o fim do ciclo da planta para a coleta de sementes.

Para o cultivo de plantas daninhas em cultura de tecidos não se conhece especificamente quais meios de cultura seriam mais adequados para o seu estabelecimento *in vitro*, porém os mesmos princípios utilizados em plantas cultivadas já estabelecidas, podem ser aplicados para espécies daninhas, no que diz respeito ao uso de reguladores de crescimento, como a citocinina sintética benzilaminopurina (BAP).

O BAP é muito utilizado na regeneração de plantas *in vitro* pois promove a quebra da dominância apical, estimula brotações e induz a proliferação de gemas axilares (HU; WANG, 1983). Este regulador atua na divisão celular, na formação do aparelho fotossintético, promovendo a expansão foliar (TAIZ; ZEIGER, 2017) resultando no aumento do crescimento dos explantes, portanto pode ser utilizado na regeneração *in vitro* de plantas daninhas também.

Com o uso da cultura de tecidos e produção de clones da planta mãe suspeita de resistência, obtém-se população homogênea e a garantia de que as plantas possuem exatamente os mesmos caracteres e fatores de resistência da planta mãe, possibilitando maiores chances de sucesso para os testes. O uso da cultura de tecidos em herbologia é uma ferramenta bastante promissora que auxilia no desenvolvimento de tecnologia e no avanço desta área. Desta forma, este trabalho explora a técnica de cultura de tecidos para detecção de resistência e a validação deste método poderá auxiliar nas recomendações de manejo e na tomada rápida de decisão para o controle destas plantas daninhas, evitando assim maiores danos econômicos às culturas.

Diante disso, o trabalho teve como hipótese que através do método de cultivo *in vitro* é possível detectar biótipos de picão-preto, capim-arroz e arroz daninho resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS e determinar sua resistência de forma rápida. O objetivo geral da pesquisa foi determinar a resistência

de picão-preto, capim-arroz e arroz daninho aos herbicidas inibidores da ALS, através do cultivo in vitro com adição de herbicidas.

Os objetivos específicos foram: Detectar biótipos de picão-preto, capim-arroz e arroz daninho suscetíveis e resistentes aos inibidores da ALS; Determinar o melhor meio de cultivo para a regeneração in vitro de picão-preto e capim-arroz; Determinar a concentração dos herbicidas imazetapir e imazapir+imazapique necessária para 95% de controle dos biótipos suscetíveis de cada espécie; Avaliar o crescimento de explantes de picão-preto, capim-arroz e arroz daninho resistentes e suscetíveis aos inibidores da ALS; Determinar as concentrações dos herbicidas adicionadas ao meio de cultura em que é possível distinguir as plantas resistentes das suscetíveis.

2 CAPÍTULO I - Detecção de biótipo de picão-preto resistente a herbicida inibidor da ALS pelo método de cultivo in vitro

2.1 Introdução

A cultura da soja, principal cultivo do Brasil, possui grande importância econômica e representa aproximadamente 60% da área total cultivada com culturas anuais (CONAB, 2018). As plantas daninhas, presentes nos sistemas agrícolas, interferem no desenvolvimento das culturas podendo ocasionar prejuízos de até 94% na produtividade da cultura da soja (ZANDONÁ, 2016). Desta forma, a presença de plantas daninhas na lavoura e a convivência com a cultura por período prolongado causam grande dano econômico ao final da safra se não controladas no momento certo.

O controle de plantas daninhas tem sido realizado basicamente pelo uso de herbicidas, em virtude de menor custo e maior eficiência quando comparado a outros métodos de controle. Em função da utilização intensiva de herbicidas, tem-se observado a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes (GAZZIERO et al., 2009). As plantas daninhas resistentes a herbicidas são de difícil controle, completam seu ciclo produzindo sementes que realimentam o banco de sementes e contribuem na disseminação da resistência.

Dentre as diversas plantas daninhas que apresentam problemas de resistência na cultura da soja, destaca-se o picão-preto (*B. pilosa*). Esta planta pertencente à família *Asteraceae*, tem distribuição em todo o mundo, sendo uma das espécies daninhas mais competitivas nos sistemas de produção agrícola (SANTOS; CURY, 2011). O picão-preto tem alta produção de sementes, e estas são facilmente dispersadas a longas distâncias principalmente pela característica morfológica da semente que possibilita sua aderência a pelos de animais. A espécie é encontrada

em todo o território nacional, porém concentra-se nas áreas agrícolas da região Centro-Sul, onde se constitui numa das mais importantes plantas daninhas em culturas anuais, sendo sua presença quase constante em todas as épocas do ano (SANTOS; CURY, 2011). Outra característica da espécie, é que esta apresenta biótipos resistentes a quatro mecanismos de ação de herbicidas no mundo: inibidores das enzimas Acetolactato sintase (ALS), Enolpiruvil Shiquimato Fosfato sintase (EPSPs) e do Fotossistema (FS) I e II. No Brasil, há biótipos resistentes a inibidores do FSII e da ALS (HEAP, 2018) o que dificulta o seu controle químico.

A medida mais importante de prevenção e controle de biótipos resistentes é a rotação do mecanismo de ação, a fim de restabelecer o controle químico eficaz. Este procedimento depende da confirmação da presença de plantas daninhas resistentes a herbicidas no campo (MATZENBACHER et al., 2013). Quando há suspeita de casos de resistência de plantas daninhas no campo, a comprovação científica desta resistência pode ser feita através de experimentos a campo, em casa de vegetação e também em laboratório.

A detecção precoce da resistência de biótipos de picão-preto auxilia na rápida tomada de decisão quanto ao uso de métodos de controle buscando evitar a disseminação da resistência para áreas adjacentes. Com o método de cultivo in vitro, tem-se maior praticidade e rapidez para a constatação da resistência de biótipos, podendo obter resposta em até dez dias, ao contrário dos métodos tradicionais em casa de vegetação que, se considerado da observação do escape a campo, a obtenção da semente do biótipo suspeito e dos resultados, pode chegar a 150 dias.

Existe necessidade da realização de pesquisas para desenvolver testes rápidos de detecção da resistência, bem como aprimorar os métodos já existentes para que sejam mais rápidos e que a resistência possa ser detectada ainda na mesma estação de cultivo. Os objetivos do trabalho foram: detectar biótipos de picão-preto resistente e suscetível a ALS na região do Planalto (RS); determinar o melhor meio de cultivo para regeneração de picão-preto in vitro; determinar a concentração do herbicida imazetapir necessária para 95% de controle da população do biótipo suscetível; avaliar o crescimento dos explantes resistentes e suscetíveis submetidos a diferentes concentrações do herbicida imazetapir; e,

determinar a concentração do herbicida imazetapir adicionada ao meio em que se é possível distinguir planta suscetível de resistente.

2.2 Material e Métodos

Para obtenção da concentração de herbicida necessária para o teste de resistência de picão-preto em cultivo in vitro, realizou-se três experimentos: O primeiro consistiu na coleta de sementes e escolha dos biótipos resistentes e suscetíveis a serem utilizados no teste; o segundo experimento consistiu na seleção de meio de cultivo para a regeneração in vitro de picão-preto; e, o terceiro experimento foi composto por ensaios de curvas de dose resposta de biótipos de picão-preto suscetível e resistente ao herbicida imazetapir no cultivo in vitro.

2.2.1 Detecção de biótipos de picão-preto suscetível e resistente a ALS

Sementes de plantas de picão-preto que sobreviveram a aplicações de herbicidas inibidores da enzima ALS foram coletadas em lavouras na região norte do Estado do Rio Grande do Sul. Cada ponto amostrado, identificado por coordenadas geodésicas através do *Global Positioning System* (GPS), correspondeu às sementes provenientes de uma planta, identificada por técnicos como plantas que sobreviveram à aplicação de herbicidas inibidores da ALS.

Foram coletadas 34 amostras de sementes nos municípios de Passo Fundo e Coxilha, as quais foram limpas, identificadas e armazenadas em câmara fria (15°C) no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) localizado no Município de Capão do Leão - RS.

Para comprovação da resistência e escolha de biótipos suscetível e resistente para os testes in vitro, foi realizado experimento no período de novembro de 2016 a janeiro de 2017, em casa de vegetação do Centro de Herbologia (CEHERB) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), no Município de Capão do Leão - RS.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os biótipos foram semeados em bandejas com capacidade volumétrica de 8L e espaçamento entre linhas de 10 cm, totalizando três biótipos por bandeja.

Utilizou-se substrato orgânico e solo coletado do Centro Agropecuário da Palma, classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico solódico (EMBRAPA, 2013).

Quando as plantas de picão-preto se encontravam no estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas, procedeu-se a aplicação do herbicida imazetapir, na dose recomendada de 1L ha^{-1} (100g.i.a ha^{-1}) (AGROFIT, 2018). Para a aplicação dos herbicidas foi utilizado pulverizador costal, pressurizado com CO_2 , munido com bicos tipo leque e pontas 110.015, espaçadas a 50 cm, com pressão constante de 1 bar ($1,0197\text{ kgf cm}^{-2}$), regulado para volume de calda equivalente a 120L ha^{-1} .

A variável controle foi avaliada visualmente aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) sendo os biótipos identificados de acordo com a resposta aos herbicidas como suscetíveis ou resistentes, adotando-se escala binária onde zero (0) representou a morte das plantas (suscetível) e um (1) a ausência de sintomas (resistente). As plantas resistentes que sobreviveram foram cultivadas em casa de vegetação e posteriormente estabelecidas in vitro. Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva.

2.2.2 Seleção de meio de cultura para a regeneração in vitro de picão-preto

Para a determinação do melhor meio de cultivo para a regeneração in vitro de picão-preto, foi realizado experimento em agosto de 2016 no Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente ao Centro de Herbologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (CEHERB/FAEM/UFPel).

Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial, com 20 repetições, onde o fator A testou os meios de cultura: MS 100% (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com sacarose (30g L^{-1}) e mio-inositol ($0,1\text{g L}^{-1}$) e MS 50% (1/2MS) com sacarose (15g L^{-1}) e mio-inositol ($0,05\text{g L}^{-1}$); e, o fator B consistiu da ausência e adição do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP) a 1mg L^{-1} . O pH dos dois meios foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar (7g L^{-1}), posteriormente foram vertidos para tubos de ensaio (10mL tubo^{-1}). Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C e $1,5\text{atm}$ por 20 minutos, resfriados em temperatura ambiente até solidificação e inoculados com um explante de picão-preto por tubo (segmento nodal asséptico, com 1cm de comprimento), em câmara de fluxo laminar. Em seguida, o material foi levado para

câmara de crescimento, com fotoperíodo 16/8 horas de luz/escuro, e temperatura de 24°C durante todo o período do experimento.

As variáveis analisadas aos 14 dias após instalação do experimento foram: comprimento da parte aérea e da raiz dos explantes (cm) e porcentagem de crescimento, obedecendo escala de avaliação de 0; 50 e 100%. Sendo que o valor de 100% foi atribuído às plantas que apresentaram crescimento máximo (Figura1). Os explantes contaminados não foram contabilizados.

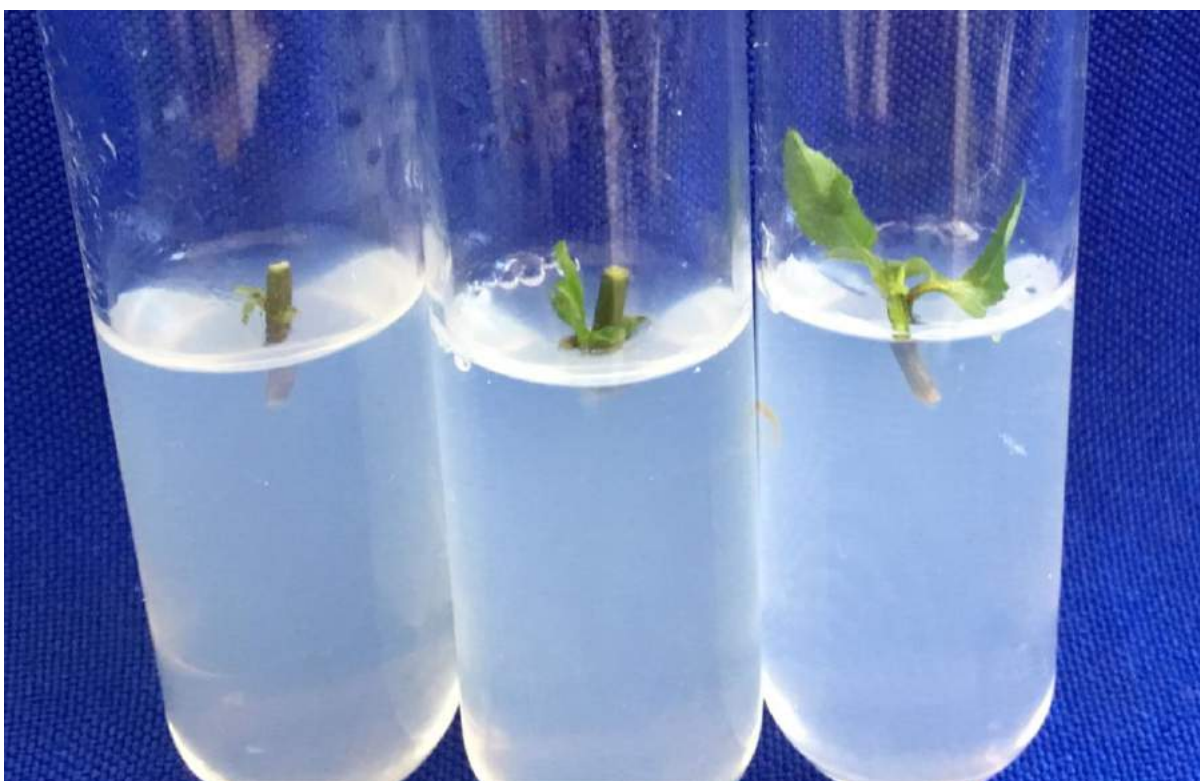


Figura 1 - Segmentos nodais de *B. pilosa* de acordo com escala adotada para avaliação de crescimento: 0; 50 e 100%. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância, os efeitos de meio de cultura e regulador BAP foram analisados pelo teste t ($p \leq 0,05$).

2.2.3 Curva de dose resposta in vitro para biótipos de picão-preto suscetível e resistente a ALS

Os ensaios foram realizados no período compreendido entre março e agosto de 2017, em câmara de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente ao Centro de Herbologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da

Universidade Federal de Pelotas (CEHERB/FAEM/UFPel). O material utilizado foi proveniente dos biótipos testados no estudo preliminar descrito no item 2.2.1 onde foram escolhidos um biótipo suscetível (P34) e outro resistente (P31). Dstes biótipos foram coletados aproximadamente 8 segmentos nodais por planta, os quais foram desinfestados para o estabelecimento in vitro. A desinfestação foi feita pela lavagem dos explantes em álcool 70% e detergente durante um minuto, imersão e agitação em solução de hipoclorito de sódio 1,5%, durante 10 minutos e tríplice lavagem com água destilada autoclavada. Os explantes estabelecidos foram multiplicados num total de 9 repicagens para produção de material vegetal para as curvas de dose resposta.

O meio de cultura utilizado MS 50% (1/2MS) e seu preparo, em todas as curvas para picão-preto, seguiu o descrito no item 2.2.2. Para as adições das concentrações do herbicida imazetapir ao meio, preparou-se soluções estoque nas concentrações de 1000 e 100 μ M, as quais foram filtradas, e retiradas alíquotas que foram adicionadas ao meio esterilizado quente, de acordo com o tratamento. Em seguida, o meio foi vertido para tubos de ensaio (10mL tubo⁻¹).

No primeiro ensaio, a escolha das concentrações para a curva dose resposta do biótipo suscetível, seguiu escala logarítmica de 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 μ M e testemunha sem aplicação, correspondendo a concentração 0.

No segundo ensaio a amplitude das concentrações foi reduzida de acordo com os resultados observados na curva do biótipo suscetível, descrita anteriormente. Desta forma foi construída curva em escala exponencial, nas seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μ M onde novamente, apenas o biótipo suscetível foi submetido a estas concentrações. Com os resultados desta segunda curva, pode-se obter a concentração necessária para o controle de 95% dos explantes oriundos de plantas suscetíveis, e assim, construir nova curva com os dois biótipos, resistente e suscetível, onde foram testadas as seguintes concentrações: 0; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 μ M.

Os tubos foram inoculados com segmento nodal de 1 cm por tubo (Figura 1), em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, o material foi levado para câmara de crescimento, com fotoperíodo 16/8 horas de luz/escuro, e temperatura de 24°C durante todo o período do experimento. As variáveis analisadas foram a porcentagem de controle aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (DAI) e comprimento de explantes (cm)

no primeiro e segundo ensaio. No terceiro ensaio as avaliações de controle foram feitas aos 5 e 10 DAI, a fim de diminuir o tempo do teste, e o comprimento dos explantes apresentado em porcentagem de crescimento em relação a testemunha. Foram considerados explantes mortos aqueles que não apresentaram desenvolvimento normal e nenhuma brotação, diferindo da testemunha (concentração zero). Os tubos que apresentaram explantes contaminados (2,5%), foram descartados e não contabilizados nas variáveis.

Os dados foram submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$) e, em caso de significância, foram analisados por regressão logarítmica e exponencial nos dois primeiros ensaios. Para o terceiro ensaio o fator biótipo foi comparado por teste t ($p \leq 0,05$) e o fator concentração por regressão sigmoidal do tipo logístico, conforme segue:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

Onde: y = porcentagem de controle; x = concentração do herbicida; e , a , x_0 e b = parâmetros da equação, sendo que “ a ” é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva, “ x_0 ” é a concentração que proporciona 50% de resposta da variável e “ b ” é a declividade da curva. O fator de resistência (FR) foi calculado pela relação R/S, que corresponde a divisão do C_{50} (concentração necessária para 50% de controle) do biótipo resistente pelo C_{50} do biótipo suscetível.

2.3 Resultados e Discussão

Os resultados e discussão de cada experimento seguem a ordem estabelecida no material e métodos.

2.3.1 Detecção de biótipos de picão-preto suscetível e resistente a ALS

A análise dos dados demonstrou que de 34 biótipos testados, 12 (35%) apresentaram resistência ao imazetapir. Constatou-se que a dose de 100g.i.a ha⁻¹ controlou 65% dos biótipos com suspeita de resistência, aplicados no estágio de três a quatro folhas (Tabela 1). Foi utilizada a maior dose recomendada do herbicida imazetapir (AGROFIT, 2018) para controle do picão-preto, uma vez que, para ser classificada como resistente, a planta deve sobreviver e se reproduzir após exposição à dose de registro do produto, obedecendo aos critérios de aplicação

(estádio vegetativo indicado, condições de clima, entre outros) (GAZZIERO et al., 2009).

Foram identificados 12 biótipos resistentes, que apresentaram sobrevivência após a aplicação do herbicida, dos quais o biótipo P31 foi selecionado como biótipo resistente nos experimentos seguintes. Os demais biótipos foram considerados suscetíveis, pois não apresentaram plantas vivas após a aplicação do tratamento, sendo que o biótipo P34 foi escolhido como suscetível a ser utilizado no experimento in vitro por apresentar região de coleta mais próxima à do biótipo resistente.

Tabela 1 - Localização geográfica e resposta de biótipos de picão-preto à aplicação de imazetapir aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	Município	Coordenadas		Resposta imazetapir
		Latitude	Longitude	
P 01	Passo Fundo	28° 13' 39"	52° 24' 10"	0 ¹
P 02	Passo Fundo	28° 13' 39"	52° 24' 10"	0
P 03	Passo Fundo	28° 13' 39"	52° 24' 10"	0
P 04	Passo Fundo	28° 13' 39"	52° 24' 10"	0
P 05	Passo Fundo	28° 13' 39"	52° 24' 10"	0
P 06	Passo Fundo	28° 13' 41"	52° 24' 46"	0
P 07	Passo Fundo	28° 13' 41"	52° 24' 46"	0
P 08	Passo Fundo	28° 13' 41"	52° 24' 46"	0
P 09	Passo Fundo	28° 13' 41"	52° 24' 46"	0
P 10	Passo Fundo	28° 13' 41"	52° 24' 46"	0
P 11	Passo Fundo	28° 13' 41"	52° 24' 46"	1
P 12	Passo Fundo	28° 13' 40"	52° 24' 35"	1
P 13	Passo Fundo	28° 13' 40"	52° 24' 35"	0
P 14	Passo Fundo	28° 13' 40"	52° 24' 35"	0
P 15	Passo Fundo	28° 13' 40"	52° 24' 35"	1
P 16	Passo Fundo	28° 13' 40"	52° 24' 35"	0
P 17	Coxilha	28° 10' 05"	52° 20' 56"	0
P 18	Coxilha	28° 10' 05"	52° 20' 56"	0
P 19	Coxilha	28° 10' 05"	52° 20' 56"	0
P 20	Coxilha	28° 10' 05"	52° 20' 56"	0
P 21	Coxilha	28° 10' 05"	52° 20' 56"	0
P 22	Coxilha	28° 11' 09"	52° 19' 30"	0
P 23	Coxilha	28° 11' 09"	52° 19' 30"	1
P 24	Coxilha	28° 11' 09"	52° 19' 30"	1
P 25	Coxilha	28° 11' 09"	52° 19' 30"	1
P 26	Coxilha	28° 11' 09"	52° 19' 30"	0
P 27	Coxilha	28° 11' 09"	52° 19' 30"	0
P 28	Passo Fundo	28° 14' 12"	52° 24' 16"	1
P 29	Passo Fundo	28° 14' 12"	52° 24' 16"	1
P 30	Passo Fundo	28° 14' 12"	52° 24' 16"	1
P 31	Passo Fundo	28° 14' 12"	52° 24' 16"	1
P 32	Passo Fundo	28° 14' 12"	52° 24' 16"	1
P 33	Passo Fundo	28° 14' 12"	52° 24' 16"	1
P 34	Passo Fundo	28° 13' 50"	52° 24' 15"	0

¹0=suscetível ou 1=resistente

Este tipo de estudo conduzido em casa de vegetação para a detecção de biótipos resistentes com aplicação de herbicidas, embora seja um método demorado e aplicado para amostras que apenas são obtidas no final do ciclo da planta, ainda é o mais empregado para a confirmação da resistência (BECKIE et al., 2000). Isto se deve ao tipo de ensaio ser a simulação mais próxima da condição em que as plantas crescem no campo e também por detectar a resistência independentemente do mecanismo de ação do herbicida (BURGOS, 2015) com menor custo, se comparado com testes que utilizam métodos moleculares ou baseados na atividade de enzimas.

2.3.2 Seleção de meio de cultura para a regeneração *in vitro* de picão-preto

Não se verificou interação entre os fatores meio de cultura e regulador de crescimento para as variáveis porcentagem de crescimento e comprimento de raiz ou efeito simples para o fator meio de cultura (dados não apresentados). Observou-se efeito simples de regulador de crescimento somente para a variável comprimento do explante (Tabela 2). Como não houve significância entre os meios, definiu-se pelo uso do meio MS 50% para o seguinte experimento, já que o desenvolvimento dos explantes foi similar com menor uso de reagentes.

Tabela 2 - Comprimento de explantes de picão-preto avaliados aos 14 dias após inoculação no meio de cultura. FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2016.

Tratamento	Comprimento do explante (cm)
Sem BAP	1,84 A
Com BAP	1,47 B
CV (%)	44,01

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, comparadas na coluna, diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Em relação ao fator regular de crescimento, constatou-se que o maior comprimento dos segmentos ocorreu no meio sem a presença do hormônio (Tabela 2). Respostas semelhantes foram observadas para picão-preto em micropropagação com uso do regulador BAP, onde os autores observaram diminuição de 33,3% na porcentagem de brotação dos segmentos nodais na presença do regulador (SANTOS, 2015).

Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), o aumento nas concentrações dos reguladores de crescimento, no meio de cultura, não implicou,

necessariamente, no melhor desenvolvimento das brotações, o que é específico para cada espécie vegetal (VIEIRA et al., 2009).

Esses resultados também são consistentes com a afirmação de Pasqual (2001), que relata que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações no cultivo *in vitro*, o que pode ser explicado pela perda da dominância apical proporcionada pelo uso do regulador de crescimento. A citocinina controla a expressão de genes envolvidos na senescência de tecidos e órgãos vegetais, inibindo-os ou retardando os efeitos fisiológicos degenerativos, implicando no aumento da longevidade celular (MORGANTE; LOMBARDI, 2004) e no estímulo de novas brotações, resultando em maior número de brotações, porém com menor comprimento.

As citocininas também possuem papel essencial no crescimento da parte aérea, uma vez que são responsáveis pelo controle da divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico (JELENSKA et al., 2000). Entretanto, alguns autores afirmam que estas substâncias inibem o crescimento da parte aérea e do sistema radicular (CASTRO et al., 2007).

Hipotetiza-se que para melhor verificação do efeito desta citocinina sintética no cultivo *in vitro* de picão-preto sejam necessários estudos com maior variação de concentrações do regulador aplicadas ao meio de cultura.

2.3.3 Curva de dose resposta *in vitro* para biótipos de picão-preto suscetível e resistente a ALS

No primeiro ensaio para a variável controle do picão-preto suscetível, o modelo de regressão que se ajustou foi o logarítmico de segunda ordem, com valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,95 a 0,98 (Figura 2A, B e C), enquanto para o comprimento dos explantes o modelo que se ajustou foi o exponencial de três parâmetros com valor de R^2 de 0,99 (Figura 2D).

Concentrações acima de $1\mu\text{M}$ resultaram no controle de 100% dos explantes, independente da época de avaliação, afetando diretamente o crescimento das plantas, indicando que estas concentrações foram muito elevadas. Por outro lado, com concentrações inferiores a $0,1\mu\text{M}$, a média de controle observada foi muito baixa, sendo que a concentração de $0,01\mu\text{M}$ atingiu valor de controle de 14,3% e a concentração $0,1\mu\text{M}$ controle de 56,6% (Figura 2). Desta forma, optou-se por

elaborar uma nova curva no segundo ensaio, no intervalo de concentrações entre 0,1µM e 1µM, afim de encontrar a concentração para controle efetivo do picão-preto.

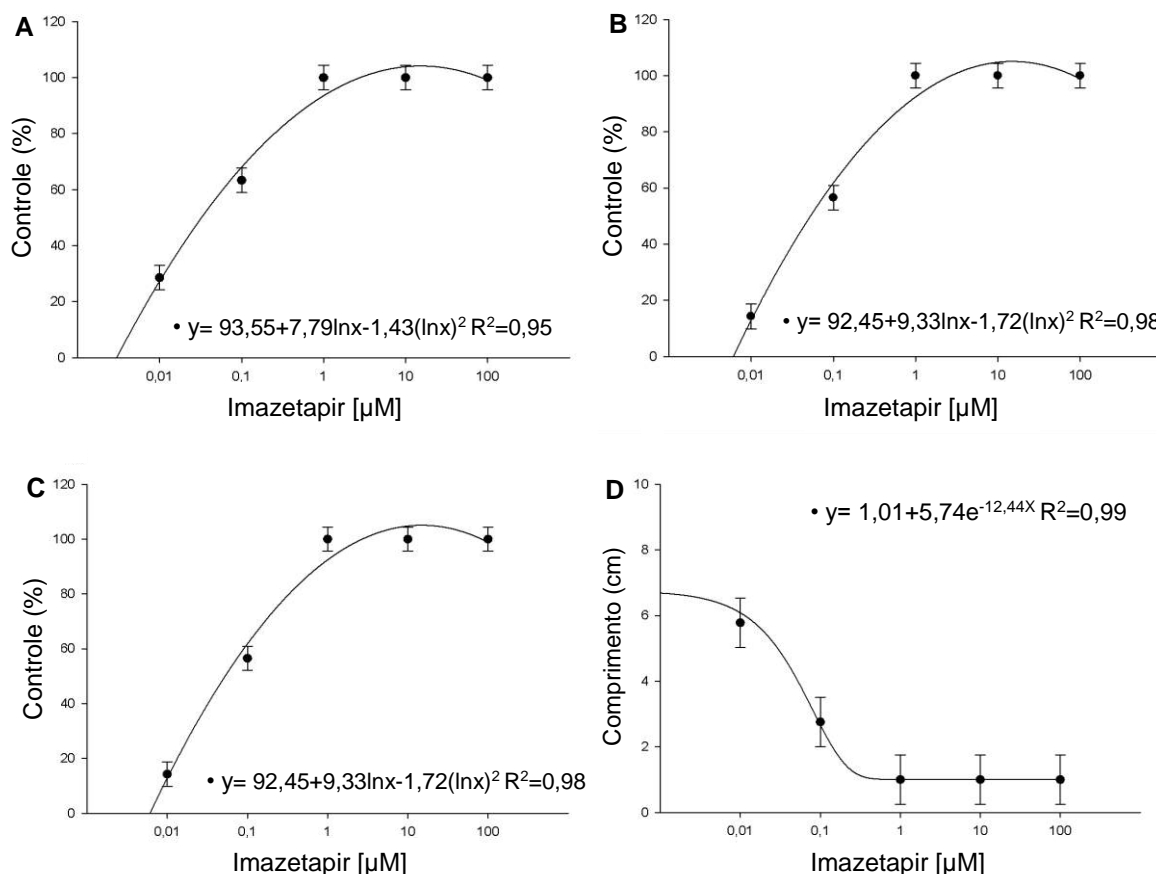


Figura 2 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível ao imazetapir, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (D) aos 21 DAI. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

No segundo ensaio, também realizado apenas com o biótipo suscetível, o modelo que se ajustou à curva de controle foi o de regressão sigmoidal do tipo logístico com valores de R^2 de 0,97 a 0,99 (Figura 3A, B e C) e, para o comprimento dos explantes, ajustou-se o modelo exponencial com valor de R^2 de 0,97 (Figura 3D).

Constatou-se valores de controle superiores a 90% nas concentrações 0,4; 0,8 e 1,6µM, em todas as épocas de avaliação, sendo que estas não diferiram entre si pelo intervalo de segurança (Figura 3A, B e C). No mesmo intervalo de concentrações houve inibição do crescimento dos explantes resultando na queda exponencial do comprimento (Figura 3D). Já as concentrações 0,1 e 0,2µM não

atingiram valores superiores a 25% e 75%, respectivamente, em todas as épocas de avaliação (Figura 3A, B e C). Através dos valores da equação obtidos na segunda época de avaliação, foi possível estabelecer a concentração necessária para 95% de controle do biótipo suscetível, que foi a concentração 0,6 μ M.

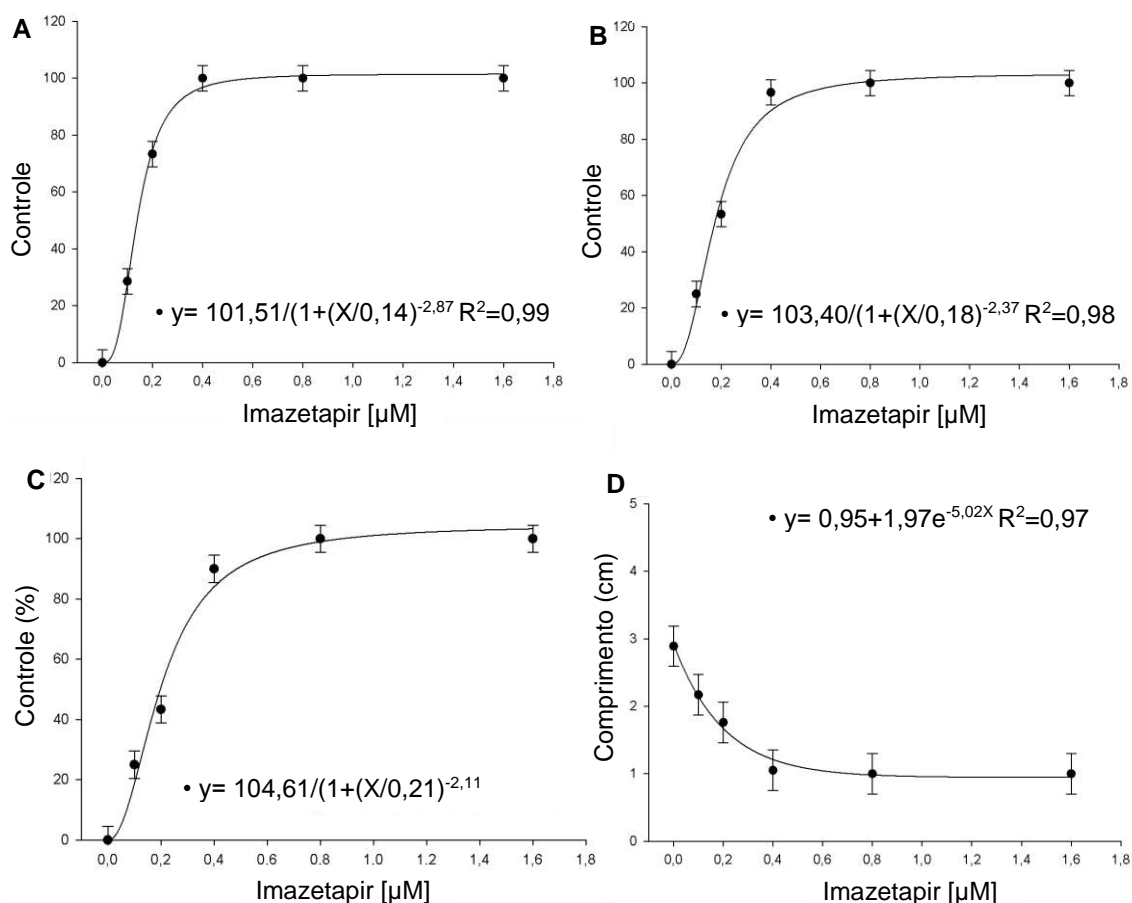


Figura 3 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível ao imazetapir, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (D) aos 21 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

As diferenças no controle entre a segunda e a terceira época de avaliação, foram mínimas, evidenciando que a resposta pode ser dada já na segunda época, diminuindo o tempo do teste. Portanto, a concentração determinada como sendo a concentração eficiente foi 0,6 μ M, que foi testada juntamente com as demais concentrações para os dois biótipos no terceiro ensaio de curva de dose resposta.

No terceiro ensaio, verificou-se interação entre os fatores biótipos e concentrações do herbicida para todas as variáveis. O modelo de regressão que se ajustou ao controle dos explantes foi o sigmoidal do tipo logístico em ambas épocas de avaliação. Os valores de R^2 variaram de 0,95 a 0,96 e 0,86 a 0,89, para os

biótipos suscetível e resistente, respectivamente (Figura 4A e B). Para o crescimento dos explantes ajustou-se o modelo exponencial de três parâmetros com valores de R^2 de 0,93 e 0,99 (Figura 4C), demonstrando ajuste satisfatório dos dados aos modelos.

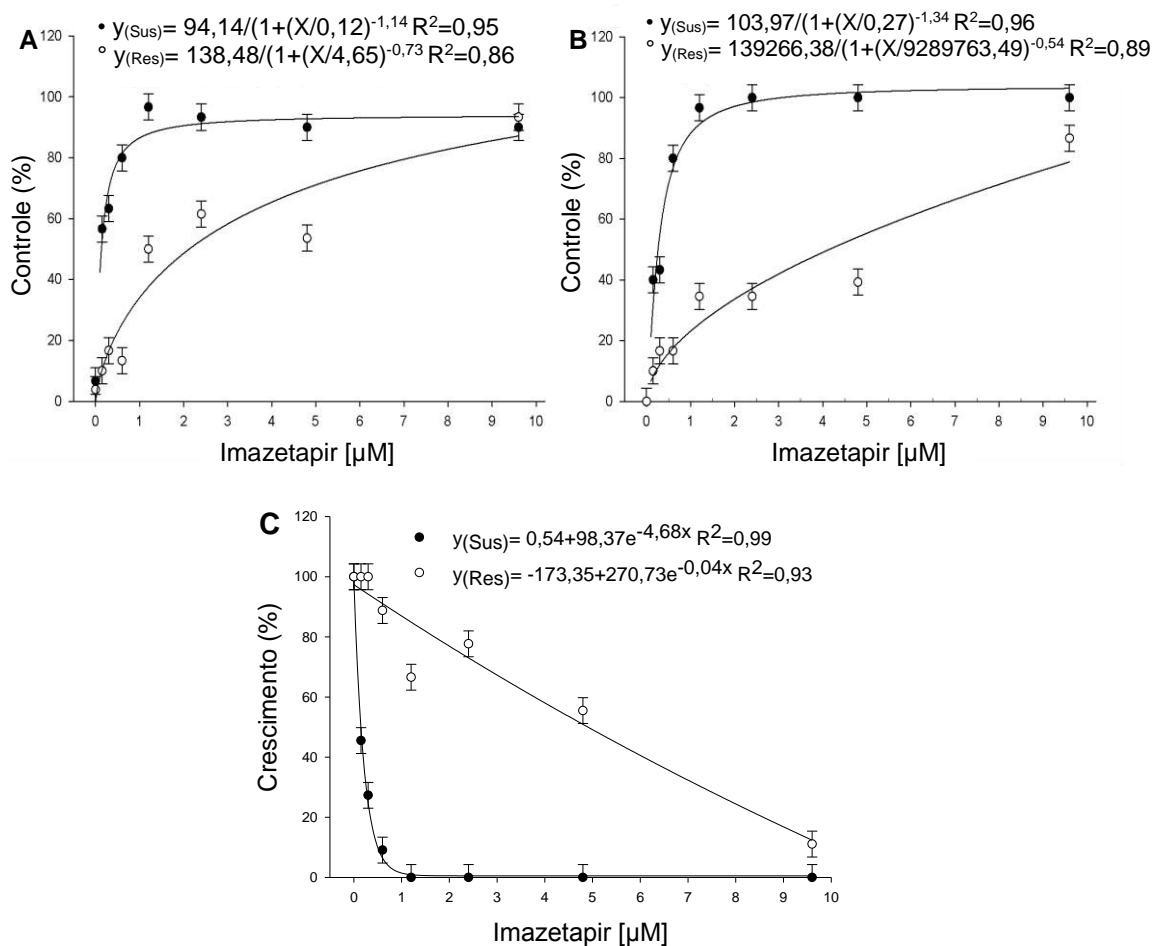


Figura 4 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazetapir, em diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A), 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e crescimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

As equações construídas com os valores de controle, em resposta às concentrações crescentes do herbicida imazetapir, comprovam que os biótipos de picão-preto suscetível e resistente respondem de modo diferente ao herbicida no cultivo in vitro, nas duas épocas de avaliação.

Aos cinco DAI, para o biótipo suscetível, observou-se controle superior a 93% no intervalo de concentrações de 1,2 a 9,6 μ M, as quais não diferiram entre si pelo intervalo de confiança (Figura 4A). Para o biótipo resistente, os valores de controle não foram superiores a 16% nas concentrações 0,15; 0,3 e 0,6 μ M, que não

diferiram entre si e da testemunha (Figura 4A). Ainda na primeira época, observou-se pelos parâmetros da equação, que a concentração de $0,13\mu\text{M}$ do herbicida, foi suficiente para obter controle de 50% do biótipo suscetível, enquanto que, para mesmo nível de controle do biótipo resistente a concentração necessária foi $2,13\mu\text{M}$ de imazetapir, o que corresponde a três vezes a concentração eficiente (Figura 4A).

Aos dez DAI, para o biótipo suscetível, foi observado controle superior a 96% no intervalo de concentrações entre $1,2$ e $9,6\mu\text{M}$, não havendo diferença entre estas concentrações pelo intervalo de confiança (Figura 4B). Para o biótipo resistente, o controle não foi superior a 16% nas concentrações $0,15$; $0,3$ e $0,6\mu\text{M}$, que não diferiram entre si (Figura 4B). Para este mesmo biótipo no intervalo de concentrações de $1,2$ a $4,8\mu\text{M}$ o controle máximo observado foi de 39%, e somente na maior concentração do ensaio ($9,6\mu\text{M}$) o controle atingiu 86% (Figura 3B), diferenciando-se dos demais tratamentos. Ainda na segunda época, foi necessário $0,26\mu\text{M}$ de imazetapir para 50% de controle do biótipo suscetível, enquanto que para o resistente foram necessários $3,9\mu\text{M}$, ou seja, cerca de seis vezes a concentração eficiente (Figura 4B).

Para a variável crescimento, houve decréscimo conforme o aumento das concentrações de herbicida aplicadas, sendo observado para o biótipo suscetível, a maior média na testemunha (100%), diferenciando-se dos tratamentos. As concentrações entre $1,2$ e $9,6\mu\text{M}$ apresentaram crescimento interrompido (0%) não diferenciando entre si para este biótipo (Figura 4C). Para o biótipo resistente não foi observada a mesma inibição no crescimento, houve diminuição gradativa de acordo com o aumento das concentrações, sendo que nas três primeiras não houve diferença (0 ; $0,15$ e $0,3\mu\text{M}$), apenas a maior concentração ($9,6\mu\text{M}$) apresentou grande diminuição, com apenas 11,1% de crescimento (Figura 4C).

A C_{50} para o biótipo suscetível foi de $0,13$ e $0,26\mu\text{M}$ na primeira e segunda avaliação, respectivamente, e para o biótipo resistente foi de $2,1$ e $3,9\mu\text{M}$. Desta forma, o FR foi superior a dez (16,4 na primeira avaliação e 15 na segunda), comprovando a resistência do biótipo P31 ao imazetapir. Em estudos de curva de dose resposta com biótipos de picão-preto suscetível e resistente ao imazetapir, foram observados valores de fator de resistência de 27,03 para o biótipo resistente estudado (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI; DIAS, 2000). Esta situação é comum para espécies resistentes aos inibidores da ALS sendo que a mutação na enzima

pode resultar em fator de resistência elevado (HAN et al., 2012) e necessidade de utilização de doses elevadas para controle de plantas resistentes (LAMEGO et al., 2011; BECKIE et al., 2012).

As diferenças observadas no controle entre a primeira e a segunda avaliação, podem ser causadas pelo tempo necessário para a ação do herbicida e aparecimento dos sintomas. Herbicidas inibidores da ALS podem levar até dois meses para causar morte completa de plantas no campo, já a atividade da ALS in vitro pode ser inibida em minutos com concentrações nano molares de herbicida (COOB; READE, 2010), porém em condições de cultivo in vitro, o tempo necessário para a morte da planta é desconhecido. Em termos de perdas de produtividade no campo em função da convivência com as plantas daninhas, os cinco dias entre uma época de avaliação e outra, representam uma grande diferença na tomada de decisão para o controle. O período de convivência entre a cultura e as plantas daninhas pode estimar o nível do dano ocasionado pela competição, onde, quanto maior o período que a cultura convive com a planta daninha maiores serão os danos ocasionados a produtividade de grãos (SILVA, et al., 2009; FURTADO, et al., 2012).

Considerando o tempo de convivência da planta daninha com a cultura, se torna de grande importância que a resposta do teste de resistência pelo cultivo in vitro possa ser obtida aos cinco DAI. Outro fator de extrema importância é o tempo disponível para a tomada de decisão em efetuar o controle alternativo em função do resultado do teste. Dez dias para obtenção da resposta pode ser um período bastante prolongado, possibilitando que a planta resistente continue crescendo e atinja um estágio de desenvolvimento que já não possa mais ser controlada com outros herbicidas. Assim sobrevivendo a novas tentativas de controle, se reproduzindo, reinfestando o banco de sementes e aumentando a população resistente da área.

A segunda época de avaliação proporcionou melhor visibilidade dos sintomas do herbicida, entretanto o teste t demonstrou que já na primeira época de avaliação pode-se observar diferença entre biótipo suscetível e resistente mesmo na menor concentração utilizada, sendo possível discriminar os biótipos apenas com 0,15 μ M de imazetapir, porém com controle do biótipo suscetível inferior a 80% (Tabela 3).

Tabela 3 - Controle visual (%) de explantes de picão-preto suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazetapir em diferentes concentrações do herbicida aos 5 e 10 DAI e crescimento da parte aérea dos explantes aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.

Concentração (μM)	Controle (%)				Crescimento (%)	
	5 DAI ¹		10 DAI ¹		Sus	Res
	Sus	Res	Sus	Res		
0,0	6,7 ^{ns}	3,9	0,0 ^{ns}	0,0	100,0 ^{ns}	100,0
0,15	56,7 [*]	10,0	40,0 [*]	10,0	45,5 [*]	100,0
0,3	63,3 [*]	16,7	43,3 [*]	16,7	27,3 [*]	100,0
0,6	80,0 [*]	13,3	80,0 [*]	16,7	9,1 [*]	88,8
1,2	96,7 [*]	50,0	96,7 [*]	34,6	0,0 [*]	66,6
2,4	93,3 [*]	61,5	100,0 [*]	34,6	0,0 [*]	77,7
4,8	90,0 [*]	53,6	100,0 [*]	39,3	0,0 [*]	55,5
9,6	90,0 ^{ns}	93,3	100,0 ^{ns}	86,7	0,0 [*]	11,1
C.V. (%)	47,5		53,2		12,7	

¹ Dias após a inoculação; ^{ns} não significativo e ^{*}significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) na mesma linha, dentro de cada época de avaliação.

Para discriminação entre os biótipos com controle de no mínimo 80% do biótipo suscetível 0,6 μM , considerada concentração eficiente, foi melhor discriminadora do comportamento diferencial entre biótipos, pois resultou em elevada eficiência de controle do biótipo suscetível e níveis de controle muito baixos do biótipo resistente. Ademais, este valor de 80% de controle do biótipo suscetível é considerado controle efetivo do picão-preto com imazetapir, para a cultura da soja (INDICAÇÕES, 2016). Em testes rápidos de resistência via imersão foliar, com biótipos de *Euphorbia heterophylla* resistente ao imazetapir, foram observados níveis de controle semelhantes, sendo que o biótipo suscetível apresentou 96% de controle enquanto que o resistente teve apenas 16% de controle, aos 10 dias após a aplicação dos tratamentos (TREZZI et al., 2011).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um processo em evolução, onde sua dinâmica e seu impacto são dependentes de alguns fatores, por exemplo: genético (número e frequência de genes de resistência), biologia das espécies de plantas (capacidade de produção de sementes), herbicidas (sítio de ação, atividade residual) e operacionais (dose do herbicida, habilidade do operador) (POWLES; YU, 2010). Como os herbicidas são agentes selecionadores dos biótipos resistentes, a intensidade de seleção depende do número de anos de uso de produtos com o mesmo mecanismo de ação em determinada área (VIDAL et al., 2006).

Alguns mecanismos de resistência são resultado da dificuldade de absorção do produto, em razão de características da lâmina foliar, como rugosidade, pilosidade e composição química da cera epicuticular (SANCHOTENE et al., 2008). As ceras epicuticulares podem atuar como principal barreira à penetração de produtos químicos (LIAKOPOULOS; STAVRIANOKOU; KARABOURNIOTIS, 2001).

No teste de resistência desenvolvido neste estudo, no qual o herbicida não é fornecido via gotas de pulverização, mas sim diretamente no sistema vascular da planta devido as técnicas de cultura de tecidos, o mecanismo de resistência torna-se fundamental para a eficiência do teste. Ou seja, uma espécie daninha que possua mecanismo de resistência por redução da absorção e assim sobrevive à pulverização a campo, poderá não apresentar resistência no teste in vitro, já que neste a absorção ocorre diretamente via sistema vascular por consequência da excisão do explante.

O movimento do herbicida do meio de cultura para as plantas durante este teste não tem interferência das mesmas barreiras e condições impostas em situações a campo, até chegar ao seu local de ação. Desta forma, uma planta resistente em condições normais a campo pode não apresentar a resistência no teste in vitro, caso seu mecanismo de resistência for relacionado a absorção e diminuição da translocação do herbicida. Portanto, deve-se atentar ao mecanismo de ação do herbicida e mecanismo de resistência que o biótipo apresenta antes da aplicação do teste rápido de resistência, pois a eficiência do mesmo está diretamente relacionada a herbicidas sistêmicos e em casos de resistência que não envolvam baixa absorção e compartimentalização do herbicida impedindo sua translocação.

Estudos relacionados à absorção e translocação de moléculas de herbicida em cultivo in vitro e testes de resistência usando estes métodos de cultivo ainda são limitados. Desse modo, pesquisas tornam-se úteis para que outros herbicidas possam ser aplicados ao teste, identificar as concentrações a serem utilizadas com diferentes espécies, e assim, ampliar a aplicação deste método. Essas informações são fundamentais para que alternativas de manejo do picão-preto, como adoção de rotação, sucessão de culturas e rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação possam ser planejadas rapidamente afim de evitar a disseminação de biótipos resistentes.

2.4 Conclusões

Dos biótipos testados, cerca de um terço é considerado resistente.

O meio de cultivo que proporciona melhor crescimento de explantes de picão-preto é o meio MS 50%, sem o uso de regulador de crescimento.

O método de cultivo in vitro permite detectar biótipos de picão-preto resistente a herbicidas inibidores de ALS.

A concentração necessária para controle satisfatório de plantas suscetíveis de picão-preto cultivadas in vitro é 0,6 μ M de imazetapir, sendo possível nesta concentração, discriminar com eficiência os biótipos suscetível e resistente.

3 CAPÍTULO II - Detecção de biótipo de capim-arroz resistente a herbicida inibidor da ALS pelo método de cultivo in vitro

3.1 Introdução

O arroz desempenha importante papel na agricultura brasileira e no mundo inteiro, tanto no aspecto econômico quanto social, por ser a cultura que mais alimenta pessoas, sustenta famílias e causa grande impacto no ambiente (CANTRELL, 2002). A cultura do arroz é amplamente difundida nos Estados da região sul do Brasil, ocupando área superior a 1 milhão de hectares (IRGA, 2018). Além de fonte de renda, é responsável pelo suprimento de grande parte dos carboidratos na dieta dos brasileiros. Dos fatores que limitam a produção de arroz, é preponderante a infestação das lavouras por plantas daninhas, cuja ausência de controle pode ocasionar perdas superiores a 85% na produção de grãos (FLECK et al., 2004).

Dentre as diversas plantas daninhas que infestam a cultura do arroz, destaca-se o capim-arroz (*Echinochloa* spp.). O “complexo capim-arroz” são espécies monocotiledôneas de ciclo anual, pertencentes ao grupo de plantas de metabolismo C4 possuindo alta produção de sementes e boa adaptação a ambientes alagados (MARAMBE; AMARASINGLE, 2002). Em função destas características e de sua elevada habilidade competitiva, é considerada uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz irrigado, ocorrendo com grande frequência e distribuição nas regiões produtoras do cereal (ANDRES et al., 2007). Uma planta de capim-arroz por metro quadrado pode reduzir a produtividade de grãos de arroz entre 5 a 22%, variando conforme a cultivar semeada e a época do início da irrigação (GALON et al., 2007).

Estas espécies apresentam resistência a oito mecanismos de ação herbicida no mundo (Inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS), acetil Coenzima A carboxilase (ACCase), Enolpiruvil chiquimato fosfato sintase (EPSPs), inibidores do Fotossistema II (FSII), Inibidores parte aérea, da formação de microtúbulos, da celulose e mimetizadores de auxinas) e, no Brasil, apresenta resistência a inibidores das enzimas ALS, ACCase e aos mimetizadores de auxinas (HEAP, 2018).

Os herbicidas são a ferramenta dominante utilizada para o controle destas plantas daninhas que infestam a cultura do arroz. Principalmente os pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas, no sistema Clearfield®. Conseqüentemente, em resposta a situações de intenso uso de herbicidas, ocorre a evolução de populações de plantas daninhas resistentes (POWLES; YU, 2010; HEAP, 2018), dentre elas o capim-arroz.

Quando há suspeita de casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas nas lavouras, a comprovação científica desta resistência pode ser feita através de experimentos a campo, em casa de vegetação e em laboratório. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção rápida da resistência em monocotiledôneas, como testes baseados na atividade de enzimas (READE; COBB, 2002; YANG et al., 2007; MARSHALL; MOSS, 2008), testes com o cultivo de plântulas em solução de ágar e herbicida (KAUNDUN et al., 2011), testes de germinação de sementes em solução de herbicida para capim-arroz (CONCENÇO et al., 2008) e cultivo de afilhos de capim-arroz em solução de herbicida (MATZENBACHER et al., 2013), porém a curva de dose resposta que utiliza a planta inteira ainda é o método mais empregado.

Existe a necessidade da realização de pesquisas para desenvolver testes rápidos de detecção da resistência, bem como aprimorar os métodos já existentes para que sejam mais rápidos e que a resistência possa ser detectada ainda na mesma estação de cultivo. Com o uso do cultivo in vitro, tem-se maior praticidade e rapidez para a constatação da resistência a inibidores da ALS, podendo obter resposta em até dez dias.

A detecção precoce da resistência de biótipos de capim-arroz auxiliará na rápida tomada de decisão quanto ao uso de métodos de controle buscando evitar a disseminação da resistência para áreas adjacentes, podendo diminuir o uso e auxiliar na escolha do herbicida a ser aplicado e, conseqüentemente, diminuir os

custos de controle. Os objetivos do trabalho foram: detectar biótipos de capim-arroz resistente e suscetível a ALS de lavouras de arroz da região sul do RS; determinar o melhor meio de cultivo para regeneração de capim-arroz in vitro; determinar a concentração do herbicida imazapir+imazapique necessária para 95% de controle da população do biótipo suscetível; avaliar o crescimento dos explantes resistentes e suscetíveis submetidos a diferentes concentrações do herbicida imazapir+imazapique; e, determinar a concentração do herbicida imazapir+imazapique adicionada ao meio para que seja possível distinguir planta suscetível de planta resistente.

3.2 Material e Métodos

Para obtenção da concentração de herbicida necessária para o teste de resistência de capim-arroz em meio de cultivo in vitro, realizou-se três experimentos: O primeiro consistiu na coleta de sementes e escolha dos biótipos resistentes e suscetíveis a serem utilizados no teste; o segundo experimento consistiu na seleção de meio de cultivo para a regeneração de capim-arroz in vitro; e, o terceiro experimento foi composto por ensaios de curvas de dose resposta com biótipos de capim-arroz suscetível e resistente ao herbicida imazapir+imazapique no cultivo in vitro.

3.2.1 Detecção de biótipos de capim-arroz suscetíveis e resistentes a ALS

Sementes de plantas de capim-arroz que sobreviveram a aplicações de herbicidas inibidores da enzima ALS foram coletadas em lavouras de arroz no Estado do Rio Grande do Sul. Cada ponto de coleta, identificado por coordenadas geodésicas através do *Global Positioning System* (GPS), correspondeu às sementes provenientes de uma planta, identificada por técnicos como plantas que sobreviveram à aplicação de herbicidas inibidores da ALS.

Foram coletadas 17 amostras de sementes nos Municípios de Arroio Grande, Cachoeirinha e Santa Vitória do Palmar, as quais foram limpas, identificadas e armazenadas em câmara fria (15°C) no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) localizado no Município de Capão do Leão – RS.

Para comprovação da resistência e detecção de biótipos suscetível e resistente, foi realizado experimento no período de novembro de 2016 a janeiro de 2017, em casa de vegetação do Centro de Herbologia (CEHERB) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), no Município de Capão do Leão – RS.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os biótipos foram semeados em bandejas com capacidade volumétrica de 8L e espaçamento entre linhas de 10 cm, totalizando três biótipos por bandeja. Utilizou-se solo coletado do Centro Agropecuário da Palma/UFPel, classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico solódico (EMBRAPA, 2013).

Quando as plantas de capim-arroz se encontravam no estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas, cada biótipo recebeu a aplicação do herbicida imazapir+imazapique, na dose recomendada de 140g.p.c. ha⁻¹ (AGROFIT, 2018). Para aplicação dos herbicidas foi utilizado pulverizador costal, pressurizado com CO₂, munido com bicos tipo leque e pontas 110.015, espaçadas a 50 cm, com pressão constante de 1 bar (1,0197 kgf cm⁻²), regulado para volume de calda equivalente a 120L ha⁻¹.

A variável controle foi avaliada visualmente aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) sendo os biótipos identificados de acordo com a resposta aos herbicidas como suscetíveis ou resistentes, adotando-se escala binária onde zero (0) representou a morte das plantas (suscetível) e um (1) a ausência de sintomas (resistente). Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva.

3.2.2 Seleção de meio de cultura para a regeneração in vitro de capim-arroz

Para a determinação do melhor meio de cultivo para a regeneração in vitro de capim-arroz, foi realizado experimento em setembro de 2016 no Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente ao Centro de Herbologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (CEHERB/FAEM/UFPel).

Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial, com 20 repetições, onde o fator A testou os meios de cultura: MS 100% (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com sacarose (30g L⁻¹) e mio-inositol (0,1g L⁻¹); e MS 50% (1/2MS), com sacarose (15g L⁻¹) e mio-inositol (0,05g L⁻¹); o fator B consistiu da ausência e adição do regulador de

crescimento benzilaminopurina (BAP) a 1mg L^{-1} . O pH dos dois meios foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar (7g L^{-1}), posteriormente foram vertidos para tubos de ensaio (10mL tubo^{-1}). Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C e $1,5\text{atm}$ por 20 minutos, resfriados em temperatura ambiente até solidificação e inoculados com explante (afilho) de 2cm de capim-arroz por tubo (Figura 5), em câmara de fluxo laminar. Em seguida, o material foi levado para câmara de crescimento, com fotoperíodo 16/8 horas de luz/escuro, e temperatura de 24°C durante todo o período do experimento.

As variáveis analisadas aos 14 dias após instalação do experimento foram: o comprimento da parte aérea e da raiz dos explantes (cm) e a porcentagem de crescimento, obedecendo uma escala de avaliação de 0; 50 e 100%. Sendo que o valor de 100% foi atribuído às plantas que apresentaram crescimento máximo (Figura 5). Os tubos contaminados com presença de agentes patogênicos que interferiram no crescimento da planta, não foram contabilizados.



Figura 5 - Explantes de *Echinochloa* sp. de acordo com escala adotada para avaliação de crescimento: 0; 50 e 100%. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância, os efeitos de meio de cultura e regulador BAP foram analisados pelo teste t ($p \leq 0,05$).

3.2.3 Curva de dose resposta in vitro para biótipos de capim-arroz suscetível e resistente a ALS

Os ensaios foram realizados no período compreendido entre outubro de 2017 e janeiro de 2018, em casa de vegetação e câmara de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente ao Centro de Herbologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (CEHERB/FAEM/UFPel). O material utilizado neste estudo foi proveniente dos biótipos testados no estudo preliminar descrito no item 3.2.1, onde foram escolhidos um biótipo suscetível (CSB) e outro resistente (CRA). Estes biótipos foram semeados novamente e cultivados até estágio de desenvolvimento aproximado de V9, para produção de grande número de afilhos, sendo que os mais velhos foram eliminados. Posteriormente foi feita a coleta destes afilhos, desinfestação do material e inoculação no meio de cultura com herbicida.

A desinfestação dos afilhos foi realizada em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% e detergente por um minuto, solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% por três minutos, enxágue triplo em água destilada autoclavada e imersão por três minutos em fungicida Carboxina+Tiram (1,5mL L⁻¹).

O meio de cultura utilizado MS 50% com adição de BAP e seu preparo, em todas as curvas para capim-arroz, seguiu o descrito no item 3.2.2. Para as adições das concentrações do herbicida imazapir+imazapique ao meio, preparou-se solução estoque na concentração de 100µM de imazapir+imazapique, a qual foi filtrada e retiradas alíquotas que foram adicionadas ao meio esterilizado quente, de acordo com o tratamento. Em seguida, o meio foi vertido para tubos de ensaio (10mL tubo⁻¹).

No primeiro ensaio, a curva dose resposta do biótipo suscetível, seguiu escala exponencial de 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8µM e testemunha sem aplicação, correspondendo a concentração 0. Com os resultados desta curva e parâmetros da equação gerada, pode-se obter a concentração necessária para o controle de 95% das plantas suscetíveis, e assim, construir a segunda curva com os dois biótipos, resistente e suscetível. No segundo ensaio foi construída a curva final onde foram testados os biótipos suscetível e resistente contendo as seguintes concentrações: 0; 0,225; 0,45; 0,9; 1,8; 3,6; 7,2 e 14,4µM.

Os tubos foram inoculados com um afilho de capim-arroz com 2cm de comprimento por tubo, em câmara de fluxo laminar, com 12 repetições. Posteriormente, o material foi levado para câmara de crescimento, com fotoperíodo 16/8 horas de luz/escuro, e temperatura de 24°C durante todo o período do experimento.

As variáveis analisadas foram a porcentagem de controle e crescimento de explantes, aos 5 e 10 dias após a inoculação dos tratamentos (DAI). Foram considerados explantes mortos, aqueles que não apresentaram desenvolvimento normal e nenhuma brotação, diferindo da testemunha (concentração zero). Os tubos que apresentaram contaminação de explante, tendo seu crescimento comprometido pela ação do patógeno, não foram contabilizados (12%). Após as últimas avaliações de controle em cada ensaio, foi avaliado o comprimento dos explantes (cm) mensurando da base até o ápice do afilho (apresentados em porcentagem de crescimento em relação a testemunha, no último ensaio).

Em relação ao crescimento dos afilhos no meio de cultivo, foi observado que um intumescimento de aproximadamente 1cm se formava possivelmente devido às reservas armazenadas, portanto, os afilhos que apresentaram apenas este intumescimento inicial, sem a emissão de novas folhas, foram considerados mortos com controle eficiente pelo herbicida.

Os dados foram submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$) e, em caso de significância, foram analisados por regressão sigmoideal logística, no primeiro ensaio. No segundo ensaio o fator biótipo foi comparado por teste t ($p \leq 0,05$) e o fator concentração por regressão exponencial única de três parâmetros, conforme segue:

$$Y = y_0 + a (1 - e^{-b x})$$

Onde: y = porcentagem de controle; x = concentração do herbicida; e, a, y_0 e b = parâmetros da equação. O fator de resistência (FR) foi calculado pela relação R/S, que corresponde a divisão do C_{50} (concentração necessária para obter 50% de controle) do biótipo resistente pelo C_{50} do biótipo suscetível.

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados e discussão de cada experimento seguem a ordem estabelecida no material e métodos.

3.3.1 Detecção de biótipos de capim-arroz suscetível e resistente a ALS

Após análise dos dados observou-se que dos 17 biótipos, seis (35%) apresentaram resistência ao herbicida imazapir+imazapique. Constatou-se que a dose de 140g.p.c.ha⁻¹ de imazapir+imazapique controlou 65% dos biótipos de capim-arroz com suspeita de resistência, quando aplicados no estágio de três a quatro folhas (Tabela 4).

Tabela 4 - Localização geográfica e resposta de biótipos de capim-arroz à aplicação de imazapir+imazapique aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	Município	Coordenadas		Resposta imazapir+imazapique
		Latitude	Longitude	
CSA	Cachoeirinha	29° 57' 05"	51° 06' 50"	0 ¹
CSB	Cachoeirinha	29° 57' 03"	51° 07' 01"	0
CSC	Cachoeirinha	29° 57' 05"	51° 06' 50"	0
CSC5	Cachoeirinha	29° 57' 05"	51° 06' 50"	0
CS2	Arroio Grande	32° 19' 23"	52° 57' 34"	0
CS7	Arroio Grande	32° 19' 20"	52° 57' 22"	0
CS8	Arroio Grande	32° 19' 15"	52° 57' 04"	0
CR1	Arroio Grande	32° 19' 05"	52° 57' 44"	0
CR2	Arroio Grande	32° 19' 53"	52° 57' 14"	0
CR3	Arroio Grande	32° 19' 55"	52° 57' 54"	0
CR4	Arroio Grande	32° 19' 03"	52° 57' 10"	1
CR6	Arroio Grande	32° 19' 12"	52° 57' 09"	1
CR8	Arroio Grande	32° 19' 11"	52° 57' 17"	1
CR9	Arroio Grande	32° 19' 29"	52° 57' 47"	0
CR10	Arroio Grande	32° 19' 09"	52° 57' 16"	1
CRA	Santa Vitória do Palmar	33° 35' 37"	53° 20' 47"	1
CRB	Santa Vitória do Palmar	33° 35' 37"	53° 20' 47"	1

¹0=suscetível ou 1=resistente

Neste experimento utilizou-se a maior dose recomendada do herbicida imazapir+imazapique (AGROFIT, 2018) para controle da espécie, uma vez que para classificar uma planta como resistente, ela deverá sobreviver e se reproduzir após exposição à dose de registro do produto para controle da espécie, obedecendo aos critérios de aplicação (estádio vegetativo indicado, condições de clima, entre outros) (GAZZIERO et al., 2009).

Os resultados deste experimento permitiram identificar seis biótipos resistentes, que apresentaram sobrevivência após a aplicação do herbicida, dos quais, o biótipo CRA foi selecionado para ser o biótipo resistente nos experimentos seguintes. Os demais biótipos foram considerados suscetíveis pois não

apresentaram plantas vivas após a aplicação do tratamento, sendo que o biótipo CSB foi escolhido como o biótipo suscetível a ser utilizado no experimento *in vitro* pela maior disponibilidade e qualidade das sementes.

Os testes de resistência que envolvem experimentos em casa de vegetação com aplicação de herbicidas ainda são os métodos mais empregados para confirmação da resistência. Estes tipos de ensaios são a simulação mais próxima da condição de crescimento das plantas no campo e também podem detectar a resistência com menor custo, independentemente do mecanismo de ação do herbicida (BURGOS, 2015), se comparado com testes moleculares ou de atividade de enzimas. Esta metodologia de detecção de biótipos resistentes em casa de vegetação, embora seja a mais utilizada, é a mais demorada e é aplicada para amostras que apenas são obtidas no final do ciclo da planta (BECKIE et al., 2000).

3.3.2 Seleção de meio de cultura para a regeneração *in vitro* de capim-arroz

Não se verificou interação entre os fatores meio de cultura e regulador de crescimento para a variável comprimento da parte aérea do explante (dados não apresentados). Observou-se efeito simples de regulador de crescimento para as variáveis porcentagem de crescimento e comprimento da raiz (Tabela 5). Como não houve significância entre os meios, definiu-se pelo uso do meio MS 50% para o seguinte experimento *in vitro*, já que o desenvolvimento dos explantes foi similar com menor uso de reagentes.

Em relação ao fator regulador de crescimento, constatou-se que a maior porcentagem de crescimento ocorreu no meio com a presença do hormônio (Tabela 5), portanto, o BAP aumentou o número de brotações de capim-arroz.

Tabela 5 - Porcentagem de crescimento e comprimento da raiz de explantes de capim-arroz avaliados visualmente aos 14 dias após inoculação no meio de cultura. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2016.

Tratamento	Crescimento (%)	Comprimento da raiz (cm)
Com BAP	65,00 A ¹	0,89 A
Sem BAP	45,00 B	0,25 A
CV (%)	48,91	44,20

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, comparadas na coluna, diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Com o uso do regulador na concentração de 1mg L^{-1} , observou-se valor superior no comprimento da raiz em relação ao tratamento sem o hormônio, entretanto, estes valores não diferiram estatisticamente (Tabela 5). Respostas similares foram observadas no comprimento de brotações em cultivo in vitro de plantas de arroz, onde o aumento da concentração de BAP resultou nas maiores médias de regeneração e número de brotações, porém houve decréscimo acentuado no comprimento dos brotos (REY et al., 2009).

Os valores de porcentagem de crescimento do explante e comprimento da raiz observados no tratamento com BAP, podem ser atribuídos à atividade das citocininas na promoção da expansão foliar, ocorrendo aumento no crescimento dos explantes. Isso pode ter ocorrido em razão da alteração morfológica nas folhas, já que o BAP promove aumento na expansão foliar e na formação do aparelho fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Estudos relacionados ao efeito de reguladores de crescimento, demonstraram que concentrações mínimas de BAP podem favorecer a regeneração de brotos em meristemas e ápices caulinares de plantas de arroz usados como explantes em cultivo in vitro (AROCKIASAMY; IGNACIMUTHU, 2007). Em monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, a concentração de 5mg L^{-1} de BAP induziu as maiores médias de regeneração de brotos por explante (FRANKLIN et al., 2006), ou seja, quanto maior a concentração do regulador utilizada, maior o número de brotações induzidas e menor o comprimento das mesmas. Portanto, a concentração utilizada neste experimento (1mg L^{-1}), considerada relativamente baixa, proporcionou estímulo suficiente para auxiliar no crescimento da parte aérea e raízes de explantes de capim-arroz.

Hipotetiza-se que para melhor verificação do efeito desta citocinina sintética no cultivo in vitro de capim-arroz sejam necessários estudos com maior variação de concentrações do regulador aplicadas ao meio de cultura.

3.3.3 Curva de dose resposta in vitro para biótipos de capim-arroz suscetível e resistente a ALS

No primeiro ensaio, para a variável controle do capim-arroz suscetível, o modelo de regressão que se ajustou foi o sigmoidal logístico, com valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,86 a 0,99 (Figura 6A e B) e para o

comprimento dos explantes o modelo que se ajustou foi o exponencial de três parâmetros com valor de R^2 de 0,98 (Figura 6C).

Estudos com cultivo de plântulas de *Lolium* spp. em meio com adição de herbicidas inibidores da ALS, demonstraram que as concentrações necessárias para controle satisfatório do biótipo suscetível, encontravam-se entre 0,1 e 1 μ M, (KAUNDUN et. al., 2011). Com base nestes resultados, optou-se por elaborar diretamente a curva com as concentrações entre 0,3 e 4,8 μ M, sem ser necessária a execução da curva inicial com concentrações em escala logarítmica (0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ M).

Aos cinco dias após a inoculação (DAI), observou-se valores de controle em torno de 70% nas concentrações 0,6; 1,2 e 4,8 μ M que não diferiram entre si pelo intervalo de confiança. Observou-se uma discrepância na concentração 2,4 μ M com valor de controle em torno de 95%, diferindo-se das demais pelo intervalo (Figura 5A). Já na segunda época de avaliação, os valores de controle não apresentaram a mesma discrepância, o que pode ser explicado pelo melhor desenvolvimento dos sintomas do herbicida aos 10 DAI (Figura 6B).

Na segunda época, foi observado controle de 100% dos explantes no intervalo entre 1,2 e 4,8 μ M, não diferindo entre si, e as concentrações 0,3 e 0,6 μ M atingiram valores máximos de controle de 66,7 e 87,5%, respectivamente (Figura 6B). No mesmo intervalo de concentrações, observou-se inibição do comprimento dos explantes, resultando na queda exponencial desta variável (Figura 6C). A partir dos valores dos parâmetros da equação para a segunda época de avaliação, a concentração estabelecida para o controle de 95% do biótipo suscetível foi 0,9 μ M.

Em testes rápidos de resistência com cultivo de plântulas de *Lolium* spp. em meio com adição de iodosulfuron+mesosulfuron a morte das plântulas suscetíveis foi observada com concentrações próximas de 0,1 μ M e a diferença entre os biótipos resistentes e suscetíveis pode ser identificada aos 10 dias após o tratamento. (KAUNDUN et. al., 2011). Entretanto, o uso de plântulas pode resultar em maior controle mesmo com concentrações bem baixas, já que as plantas em estágio de desenvolvimento inicial são mais suscetíveis à ação de herbicidas, do que os filhotes adultos utilizados neste estudo.

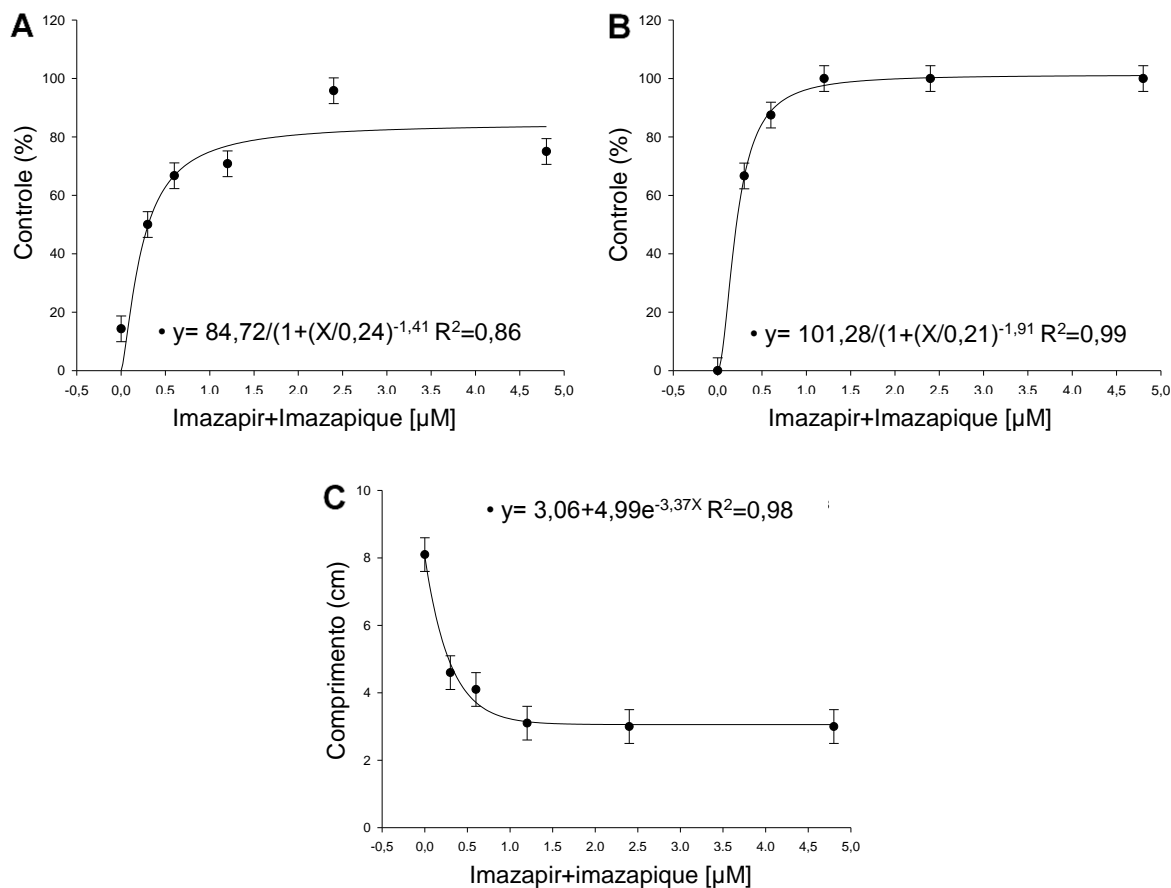


Figura 6 - Controle visual (%) de explantes de capim-arroz suscetível ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2018. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

No presente ensaio, buscou-se obter a concentração de herbicida em μM , adicionada ao meio de cultura para obter o controle mais próximo do valor de controle numa situação de aplicação da dose recomendada a campo (“concentração eficiente”). Portanto, a concentração determinada como sendo a eficiente foi $0,9\mu\text{M}$, que foi testada juntamente com as demais concentrações para os dois biótipos no segundo ensaio de curva de dose resposta.

No segundo ensaio, verificou-se interação entre os fatores biótipos e concentrações do herbicida imazapir+imazapique para todas as variáveis. A equação que se ajustou ao controle dos explantes foi de regressão exponencial de três parâmetros, sendo que os valores de R^2 variaram de 0,89 a 0,97 e 0,81 a 0,84, para os biótipos suscetível e resistente, respectivamente, nas duas épocas de avaliação (Figura 7A e B). De modo similar, a equação exponencial ajustou-se ao

crescimento dos explantes, com valores de R^2 de 0,82 a 0,96 em função de biótipo (Figura 7C), demonstrando ajuste satisfatório dos dados aos modelos.

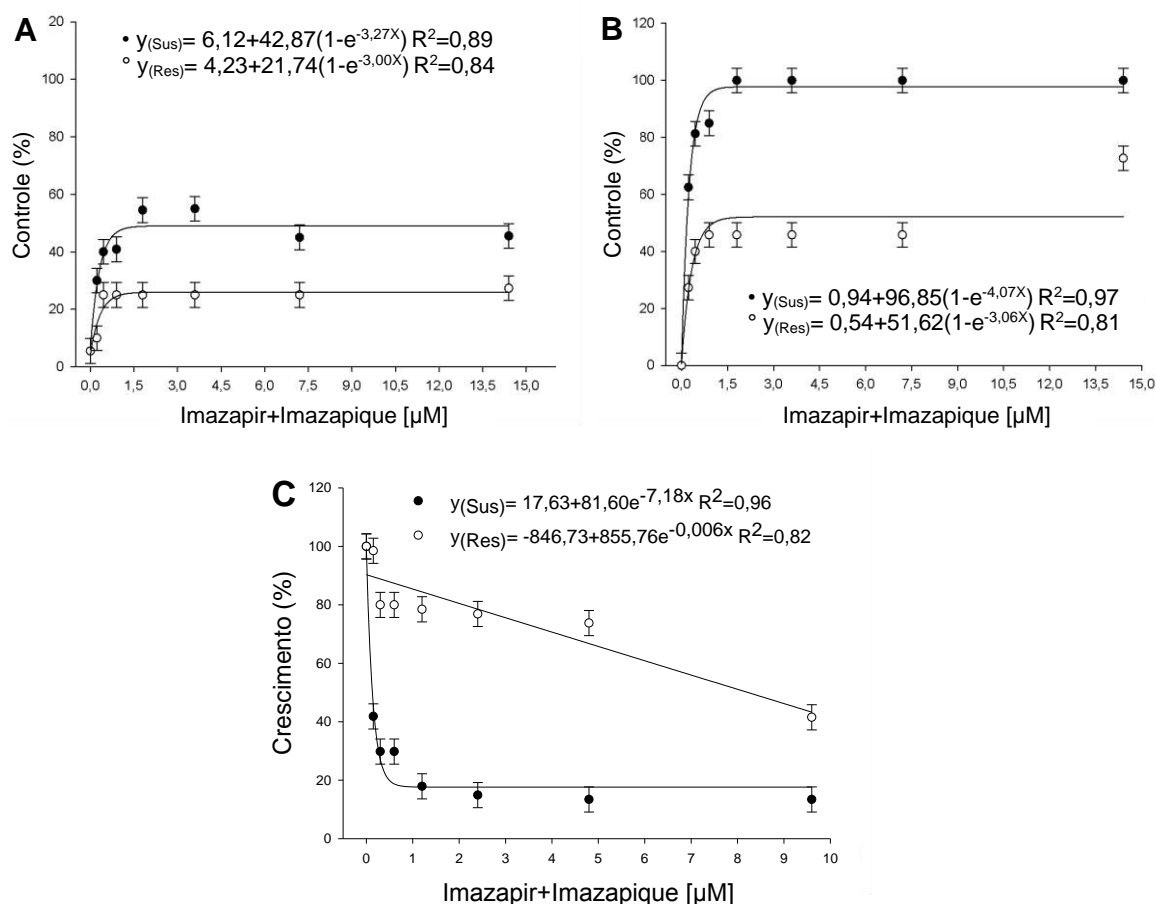


Figura 7 - Controle visual (%) de explantes de capim-arroz suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e crescimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2018. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

As equações construídas com os valores de controle, em resposta às concentrações crescentes do herbicida imazapir+imazapique, comprovam que os biótipos de capim-arroz suscetível e resistente respondem de modo diferente ao herbicida no teste in vitro, nas duas épocas de avaliação.

Aos cinco DAI, para o biótipo suscetível, o controle máximo observado foi em torno de 55% para as concentrações 1,8 e 3,6 μ M, que não diferiram entre si pelo intervalo de confiança, e as maiores concentrações da curva (7,2 e 14,4 μ M) apresentaram controle inferior, em torno de 45%, não diferindo entre si. Cabe ressaltar que nesta época de avaliação os sintomas do herbicida podem estar apenas em fase inicial, o que explica esta discrepância nos valores de controle do

biótipo suscetível (Figura 7A). Para o biótipo resistente, não houve diferença nos valores de controle no intervalo de concentrações entre 0,45 e 14,4 μ M, pelo intervalo de confiança, apresentando média de controle em torno de 27% (Figura 7A). Nesta época, nenhuma das concentrações da curva foi suficiente para atingir controle de 50%, o que não permitiu calcular o FR.

Aos dez DAI, os valores de controle do biótipo suscetível foram muito superiores, não apresentando diferenças no controle para o intervalo de concentrações de 1,8 a 14,4%, que atingiu 100%. Para o mesmo biótipo, as concentrações 0,45 e 0,9 μ M proporcionaram controle em torno de 85%, não diferindo-se pelo intervalo de confiança (Figura 7B). Para o biótipo resistente, foi observado controle em torno de 45% no intervalo de concentrações de 0,45 a 7,2 μ M, que não diferiram entre si pelo intervalo de confiança. Apenas na maior concentração da curva (14,4 μ M) o controle do biótipo resistente atingiu 72%, diferindo-se das demais concentrações (Figura 7B). Nesta época de avaliação foi necessário 0,16 μ M do herbicida para 50% de controle do biótipo suscetível, enquanto que para o resistente foi necessário 1,03 μ M, desta forma, o FR foi igual a 6,4 evidenciando que o biótipo CRA (Res) possui resistência de nível baixo ao herbicida imazapir+imazapique.

Em testes rápidos de resistência de capim-arroz, cultivando afillhos em solução com concentrações do herbicida imazapir+imazapique, foram observados níveis de controle de 90% para o biótipo suscetível e de 18% para o resistente, na concentração de 0,001mM (equivalente a 1 μ M), bem próxima ao valor de concentração eficiente utilizado neste estudo (MATZENBACHER et al., 2013).

Para a variável crescimento, verificou-se decréscimo conforme o aumento das concentrações de herbicida aplicadas, sendo observado, para o biótipo suscetível, diminuição de 60% no crescimento já na primeira concentração (0,225 μ M) diferindo da testemunha. Observou-se interrupção do crescimento do explante a partir do intervalo de concentrações de 1,8 a 14,4 μ M, as quais não se diferiram (Figura 7C). Para o biótipo resistente não foi observada esta inibição no crescimento, houve diminuição gradativa com o aumento das concentrações, sendo que a testemunha e a concentração 0,225 μ M apresentaram as maiores médias. A menor média foi observada para a concentração 14,4 μ M, com 41,5% de crescimento em relação a testemunha, diferindo-se dos demais tratamentos (Figura 7C).

Ao comparar os biótipos em cada concentração, observa-se que aos 5DAI, os biótipos apenas diferiram-se a partir de 1,8 μ M (Tabela 6). Na segunda época de avaliação e para a variável crescimento, os biótipos diferiram-se já na primeira concentração do ensaio (Tabela 6). Portanto, pelo teste t, os biótipos podem ser discriminados pelas concentrações 1,8 μ M (5DAI) e 0,225 μ M (10 DAI), embora estas concentrações não proporcionem controle de 95% do biótipo suscetível, como se espera com uso de imazapir+imazapique para controle de capim-arroz, conforme recomendações da cultura do arroz irrigado (RECOMENDAÇÕES, 2016).

Tabela 6 - Controle visual (%) de explantes de capim-arroz suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique em diferentes concentrações do herbicida aos 5 e 10 DAI e crescimento da parte aérea dos explantes aos 10 DAI. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2018.

Concentração (μ M)	Controle (%)				Crescimento (%)	
	5 DAI ¹		10 DAI ¹		Sus	Res
	Sus	Res	Sus	Res		
0,0	5,5 ^{ns}	5,5	00,0 ^{ns}	00,0	100,0 ^{ns}	100,0
0,225	30,0 ^{ns}	10,0	62,5 [*]	27,3	41,8 [*]	98,5
0,45	40,0 ^{ns}	25,0	81,3 [*]	40,0	29,8 [*]	80,0
0,9	40,9 ^{ns}	25,0	85,0 [*]	45,8	29,8 [*]	80,0
1,8	54,5 [*]	25,0	100,0 [*]	45,8	17,9 [*]	78,5
3,6	55,0 [*]	25,0	100,0 [*]	45,8	14,9 [*]	76,9
7,2	45,0 [*]	25,0	100,0 [*]	45,8	13,4 [*]	73,8
14,4	45,5 ^{ns}	27,3	100,0 [*]	72,7	13,4 [*]	41,5
C.V. (%)	74,3		50,3		8,4	

¹ Dias após a inoculação; ^{ns} não significativo e ^{*} significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) na mesma linha, dentro de cada época de avaliação.

Vale ressaltar que, para melhor eficiência do teste, a obtenção da resposta ainda aos cinco dias após a inoculação, é de extrema importância. Em termos de produtividade de grãos, cinco dias podem significar uma grande diferença, pois quanto maior o período que a cultura convive com a planta daninha maiores serão os danos ocasionados a produtividade de grãos (SILVA, et al., 2009; FURTADO, et al., 2012). Outro fator de extrema importância é o tempo disponível para a tomada de decisão em efetuar o controle alternativo em função do resultado do teste. Dez dias para obtenção da resposta pode ser um período bastante prolongado, possibilitando que a planta resistente rebrote, atinja um estágio de desenvolvimento no qual já não possa mais ser controlada com outros herbicidas e assim sobreviva a

novas tentativas de controle químico, se reproduzindo, reinfestando o banco de sementes e aumentando a população resistente da área.

Neste ensaio, para a segunda época de avaliação, a concentração de 0,9 μ M considerada concentração eficiente, foi discriminadora do comportamento diferencial entre biótipos, pois resultou em elevada eficiência de controle do biótipo suscetível e níveis de controle muito baixos do biótipo resistente. Entretanto, com a utilização de concentrações 16 vezes superiores à concentração eficiente, os níveis de controle do biótipo resistente atingiram 72,7%. Esta resposta à maior concentração do ensaio, possivelmente se relacionou ao mecanismo de resistência deste biótipo que provavelmente não é relacionado ao local de ação, por ter apresentado aumento no controle na maior concentração testada. Sugere-se, portanto, que o mecanismo de resistência do biótipo estudado seja a metabolização acentuada do herbicida, não podendo afirmar ser este o único mecanismo envolvido.

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é processo em evolução, onde sua dinâmica e seu impacto são dependentes de alguns fatores, por exemplo: genético (número e frequência de genes de resistência), biologia das espécies de plantas (capacidade de produção de sementes), herbicidas (sítio de ação, atividade residual) e operacionais (dose do herbicida, habilidade do operador) (POWLES; YU, 2010). Como os herbicidas são selecionadores dos biótipos resistentes, a intensidade de seleção depende do número de anos de uso de produtos com o mesmo mecanismo de ação em determinada área (VIDAL et al., 2006).

Controvérsias sobre a definição de resistência resultam de diferentes pontos de vista sobre a variação natural nas populações de plantas daninhas e o que é classificado como nível baixo de resistência. Em casos marginais de resistência, um biótipo que geralmente sobrevive a aplicação em condições de campo, pode sucumbir à dose recomendada, sob condições de casa de vegetação ou em testes de laboratório como este. Isto pode ocorrer porque a dose recomendada, em tais condições (casa de vegetação ou câmara de crescimento), frequentemente, é muito mais efetiva sobre as plantas daninhas do que quando o herbicida é aplicado sob condições de campo (GAZZIERO et al., 2009).

Para este teste in vitro, é de grande importância considerar que o movimento do herbicida do meio de cultura para o seu local de ação no explante, não atravessa as mesmas barreiras que se encontram numa situação de pulverização a campo. No

teste o produto é absorvido diretamente no sistema vascular da planta enquanto que a campo o herbicida precisa chegar ao local de ação via absorção foliar ou radicular, em alguns casos. Portanto, se a planta daninha possuir resistência relacionada a absorção diminuída do produto ou até mesmo baixa translocação, este é provavelmente um mecanismo de resistência no qual ela não apresentará resistência no teste in vitro, portanto não poderia ser aplicado o teste para estes casos. Deve-se atentar ao mecanismo de resistência que o biótipo apresenta para a aplicação deste teste, pois a eficiência do mesmo está diretamente relacionada a herbicidas sistêmicos e em casos de resistência que não envolvam absorção diminuída do herbicida.

Estudos relacionados ao cultivo de plantas daninhas e uso de herbicidas in vitro, são bastante limitados bem como as informações relacionadas ao movimento destas moléculas no meio de cultura para o explante. Portanto é de grande importância que mais estudos sejam realizados com plantas daninhas e herbicidas in vitro, para se obter mais informações. Desta forma, outros herbicidas e concentrações podem ser utilizados e diferentes mecanismos de resistência de plantas daninhas podem ser testados, ampliando a aplicação do teste. Tais informações são de grande importância para que alternativas de manejo da resistência do capim-arroz possam ser planejadas rapidamente, afim de evitar a disseminação da resistência da espécie.

3.4 Conclusões

Cerca de um terço dos biótipos testados é considerado resistente.

O meio de cultivo MS 50% com adição de benzilaminopurina proporciona melhor crescimento de explantes de capim-arroz.

O método de cultivo in vitro permite detectar biótipos de capim-arroz resistente a herbicidas inibidores de ALS.

A concentração necessária para controle satisfatório de plantas suscetíveis de capim-arroz cultivadas in vitro e que discrimina com eficiência os biótipos suscetível e resistente, é 0,9 μ M de imazapir+imazapique.

4 CAPÍTULO III – Detecção de biótipo de arroz daninho resistente a herbicida inibidor da ALS pelo método de cultivo in vitro

4.1 Introdução

O arroz é um dos cereais mais importantes produzidos no mundo, de grande relevância na alimentação humana, juntamente com trigo e milho. Na safra 2016/17, a área cultivada com arroz na região centro-sul do país, responsável por mais de 80% da produção nacional de arroz, foi de 1.451,0 mil hectares com produção de 10.011,9 mil toneladas e produtividade média de 6.958 kg ha⁻¹ (CONAB, 2018).

Apesar da utilização de tecnologia como insumos e cultivares com alto potencial produtivo, essa produtividade está aquém daquela alcançada em áreas de pesquisa. Isso é resultado de vários fatores, como qualidade das sementes, interferindo no estabelecimento da lavoura; manejo da cultura e de pragas (insetos, doenças e plantas daninhas) o que altera negativamente o crescimento e desenvolvimento causando prejuízos quantitativos e qualitativos à produção de grãos (ARGENTA et al., 2003).

A presença de plantas daninhas em lavouras de arroz acarreta prejuízos diretos e indiretos, devido a competição por recursos com a cultura ou servindo de hospedeiros alternativos de pragas e doenças (CONCENÇO et al., 2014). Esta interferência causada pelas plantas daninhas pode comprometer a expressão do potencial de produtividade das culturas, sendo as perdas médias na produtividade do arroz pela presença de infestantes estimadas entre 40 a 60%, podendo chegar até 96% quando não se tem o controle das mesmas (CHAUHAN; JOHNSON, 2011).

Algumas espécies de plantas daninhas, devido a sua semelhança morfofisiológica com a cultura do arroz, tornam-se de difícil controle com o uso de herbicidas, uma vez que ao controlar as mesmas, têm-se elevadas injúrias a cultura.

Aliado ao controle difícil, por pertencer à mesma família botânica, o arroz daninho (*Oryza sativa*) se torna a espécie que mais causa danos a cultura, interferindo na produtividade, diminuindo os lucros, aumentando os custos de produção e depreciando o produto final (FLECK et al., 2008).

O controle desta espécie foi feito durante um certo tempo pela aplicação de herbicidas seletivos à cultura do arroz, como imazapir+imazapique e imazetapir, em função da introdução da tecnologia Clearfield®. Estes herbicidas apresentam alta especificidade com a enzima alvo, acetolactato sintase (ALS), característica que favoreceu a seleção de plantas daninhas resistentes (HEAP, 2018). Em função desta ter sido a única tecnologia disponível para controle seletivo em pós emergência, evidenciou-se o uso repetitivo dos herbicidas inibidores de ALS, prática que favoreceu a evolução da resistência de arroz daninho.

Para um controle químico adequado e correto, o manejo da resistência de arroz daninho a ALS torna-se cada vez mais importante, assim como a detecção rápida destas plantas resistentes na lavoura de arroz. Em monocotiledôneas foi desenvolvido um teste rápido de resistência para inibidores da ALS e ACCase (KAUNDUN et al., 2011), o qual utiliza o cultivo de plântulas em solução água+ágar com adição de herbicidas. Este método é mais rápido que os testes tradicionais de casa de vegetação, porém depende da produção de sementes da planta mãe.

A detecção da resistência de biótipos de arroz daninho durante o cultivo do arroz, se torna necessária para auxiliar na tomada de decisão de estratégias alternativas de manejo, permitindo o controle das populações e evitando a disseminação de biótipos resistentes para outras áreas. Uma forma mais rápida de verificar a resistência de monocotiledôneas a ALS, é pela utilização do cultivo in vitro com filhos provenientes da planta mãe resistente. Com o método de cultivo in vitro, a praticidade e rapidez do teste se torna ainda maior, pois o tempo para a confirmação da resistência dos biótipos a ALS pode ser reduzido para até 5 dias.

Os objetivos do trabalho foram detectar biótipos de arroz daninho resistentes e suscetíveis a ALS em lavouras de arroz da região sul do RS; determinar a concentração do herbicida imazapir+imazapique necessária para 95% de controle da população do biótipo suscetível; avaliar o crescimento dos explantes resistentes e suscetíveis submetidos a diferentes concentrações do herbicida imazapir+imazapique; e, determinar a concentração do herbicida

imazapir+imazapique adicionada ao meio em que é possível distinguir planta suscetível de resistente.

4.2 Material e Métodos

Para obtenção da concentração de herbicida necessária para o teste de resistência de arroz daninho em meio de cultivo *in vitro*, realizaram-se dois experimentos. O primeiro consistiu na coleta de sementes e detecção dos biótipos resistentes e suscetíveis a serem utilizados no teste *in vitro*. O segundo experimento foi composto por ensaios de curvas de dose resposta de biótipos de arroz daninho suscetível e resistente ao herbicida imazapir+imazapique no cultivo *in vitro*.

4.2.1 Detecção de biótipos de arroz daninho suscetíveis e resistentes a ALS.

Sementes de arroz daninho que sobreviveram a aplicações de herbicidas inibidores da enzima ALS foram coletadas em lavouras de arroz do Estado do Rio Grande do Sul. Cada ponto amostrado, identificado por coordenadas geodésicas através do *Global Positioning System* (GPS), correspondeu às sementes provenientes de uma planta, identificada por técnicos como plantas que sobreviveram à aplicação de herbicidas inibidores da ALS.

Foram coletadas sete amostras de sementes nos municípios de Arroio Grande, Cachoeirinha e Cachoeira do Sul, as quais foram limpas, identificadas e armazenadas em câmara fria (15°C) no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) localizado no Município de Capão do Leão – RS.

Para comprovação da resistência e escolha dos biótipos suscetível e resistente para os testes *in vitro*, foi realizado experimento no período de novembro de 2016 a janeiro de 2017, em casa de vegetação do Centro de Herbologia (CEHERB) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), no Município de Capão do Leão – RS. O delineamento experimental, aplicação dos tratamentos e avaliações de controle foram realizadas da mesma forma como descrito no Capítulo II.

4.2.2 Curva de dose resposta in vitro para biótipos de arroz daninho suscetível e resistente a ALS

Os ensaios foram realizados no período compreendido entre outubro de 2017 e janeiro de 2018, em casa de vegetação e câmara de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente ao Centro de Herbologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (CEHERB/FAEM/UFPel). O material utilizado neste estudo foi proveniente dos biótipos testados no estudo preliminar descrito no item 4.2.1, onde foram escolhidos, um biótipo suscetível (AVSC) e outro resistente (AVRA). Estes biótipos foram semeados novamente e cultivados até estágio de desenvolvimento aproximado de V9 e, após atingirem este estágio, realizou-se a coleta dos afilhos, desinfestação do material e inoculação no meio de cultura com herbicida. A desinfestação dos afilhos, preparo do meio, adição das concentrações do herbicida, inoculação, condições de condução dos ensaios e avaliações dos explantes, foram realizadas da mesma forma como descrito no Capítulo II, porém o meio utilizado para regeneração in vitro de arroz daninho, foi o meio MS 100%, sem a adição de BAP (REY et al., 2009). Para os afilhos que apresentaram apenas intumescimento de 1cm, que se deve às reservas de energia da planta, sem a emissão de novas folhas, seu crescimento foi considerado interrompido pela ação do herbicida, e a porcentagem de explantes contaminados (excluídos e não contabilizados) em todo o experimento foi de 13,5%.

No primeiro ensaio, as concentrações para a curva dose resposta do biótipo suscetível, seguiu escala exponencial de 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 μ M e testemunha sem aplicação, correspondendo a concentração 0. Com os resultados desta curva e parâmetros da equação gerada, pode-se obter a concentração necessária para o controle de 95% das plantas suscetíveis, e assim, construir a segunda curva com os dois biótipos, suscetível e resistente. No segundo ensaio foi construída a curva final onde foram testados os biótipos suscetível e resistente contendo as seguintes concentrações: 0; 0,325; 0,65; 1,3; 2,6; 5,2; 10,4 e 20,8 μ M.

Os dados foram submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$) e, em caso de significância, analisados por regressão sigmoideal logística no primeiro ensaio. No segundo ensaio o fator biótipo foi comparado por teste t ($p \leq 0,05$) e o fator concentração por regressão exponencial única de três parâmetros, conforme segue:

$$Y = y_0 + a (1 - e^{-b \cdot x})$$

Onde: y = porcentagem de controle; x = concentração do herbicida; e , a , y_0 e b = parâmetros da equação. O fator de resistência (FR) foi calculado pela relação Resistente/Suscetível (R/S), que corresponde a divisão do C_{50} (concentração necessária para obter 50% de controle) do biótipo resistente pelo C_{50} do biótipo suscetível.

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados e discussão de cada experimento seguem a ordem estabelecida no material e métodos.

4.3.1 Detecção de biótipos de arroz daninho suscetível e resistente a ALS

A análise dos dados mostrou que dos sete biótipos testados, quatro (57%) apresentaram resistência ao herbicida imazapir+imazapique, sendo que os três biótipos restantes mostraram suscetibilidade ao herbicida (Tabela 7).

Tabela 7 - Localização geográfica e resposta de biótipos de arroz daninho à aplicação de imazapir+imazapique aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	Município	Coordenadas		Resposta imazapir+imazapique
		Latitude	Longitude	
AV07	Arroio Grande	32° 19' 06"	52° 57' 01"	1 ¹
AVSC	Cachoeirinha	29° 57' 05"	51° 08' 02"	0
AV04	Arroio Grande	32° 19' 30"	52° 54' 21"	0
AV09	Arroio Grande	32° 19' 41"	52° 54' 31"	1
AV03	Arroio Grande	32° 19' 20"	52° 57' 16"	0
AVRA	Cachoeira do Sul	30° 05' 40"	52° 54' 12"	1
AVRB	Cachoeira do Sul	30° 05' 43"	52° 54' 59"	1

¹0=suscetível ou 1=resistente

Neste experimento foi utilizada a maior dose recomendada do herbicida imazapir+imazapique para o controle dos biótipos de arroz daninho, pois para a planta ser considerada resistente ela deve sobreviver e se reproduzir após exposição à dose de registro do produto para controle da espécie, obedecendo critérios de aplicação como estágio vegetativo e condições de clima (GAZZIERO et al., 2009; AGROFIT, 2018).

Os resultados deste experimento permitiram identificar quatro biótipos resistentes que apresentaram sobrevivência após o tratamento, dos quais, o biótipo AVRA foi selecionado para ser o biótipo resistente nos experimentos seguintes. Os

demais biótipos foram considerados suscetíveis pois não apresentaram plantas vivas após a aplicação do herbicida, sendo que o biótipo AVSC foi escolhido como o biótipo suscetível a ser utilizado nos ensaios in vitro em função da disponibilidade de sementes.

Este tipo de estudo conduzido em casa de vegetação para a detecção de biótipos resistentes com aplicação de herbicidas, embora seja um método demorado e aplicado para amostras que apenas são obtidas no final do ciclo da planta, ainda é o mais empregado para a confirmação da resistência (BECKIE et al., 2000). Estes ensaios simulam de forma mais próxima as condições de campo em que a planta estaria submetida e podem ser usados para detectar resistência em diferentes mecanismos de ação com menor custo (BURGOS, 2015), em relação a testes de laboratório a nível molecular e de atividade enzimática.

4.3.2 Curva de dose resposta in vitro para biótipos de *arroz daninho* suscetível e resistente a ALS

No primeiro ensaio, o modelo de regressão que melhor se ajustou a curva de controle do arroz daninho foi o sigmoidal logístico, com valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,87 a 0,98 (Figura 8A e B), e, para o comprimento dos explantes o modelo ajustado foi o exponencial de três parâmetros com valor de R^2 de 0,98 (Figura 8C).

Aos cinco dias após a inoculação (DAI), observou-se controle bastante baixo, mesmo na maior concentração utilizada ($4,8\mu\text{M}$), que proporcionou controle de apenas 50% dos explantes, diferindo das demais, indicando o início do aparecimento dos sintomas (Figura 8A). Aos dez DAI, os sintomas foram mais visíveis e foi observado controle superior a 90% nas concentrações 1,2; 2,4 e $4,8\mu\text{M}$, não diferindo entre si (Figura 8B). Na mesma época, o comprimento dos explantes diminuiu drasticamente com a aplicação das concentrações, que não diferiram entre si. Apenas a testemunha, que apresentou a maior média (8,5cm), diferiu-se dos demais tratamentos (Figura 8C).

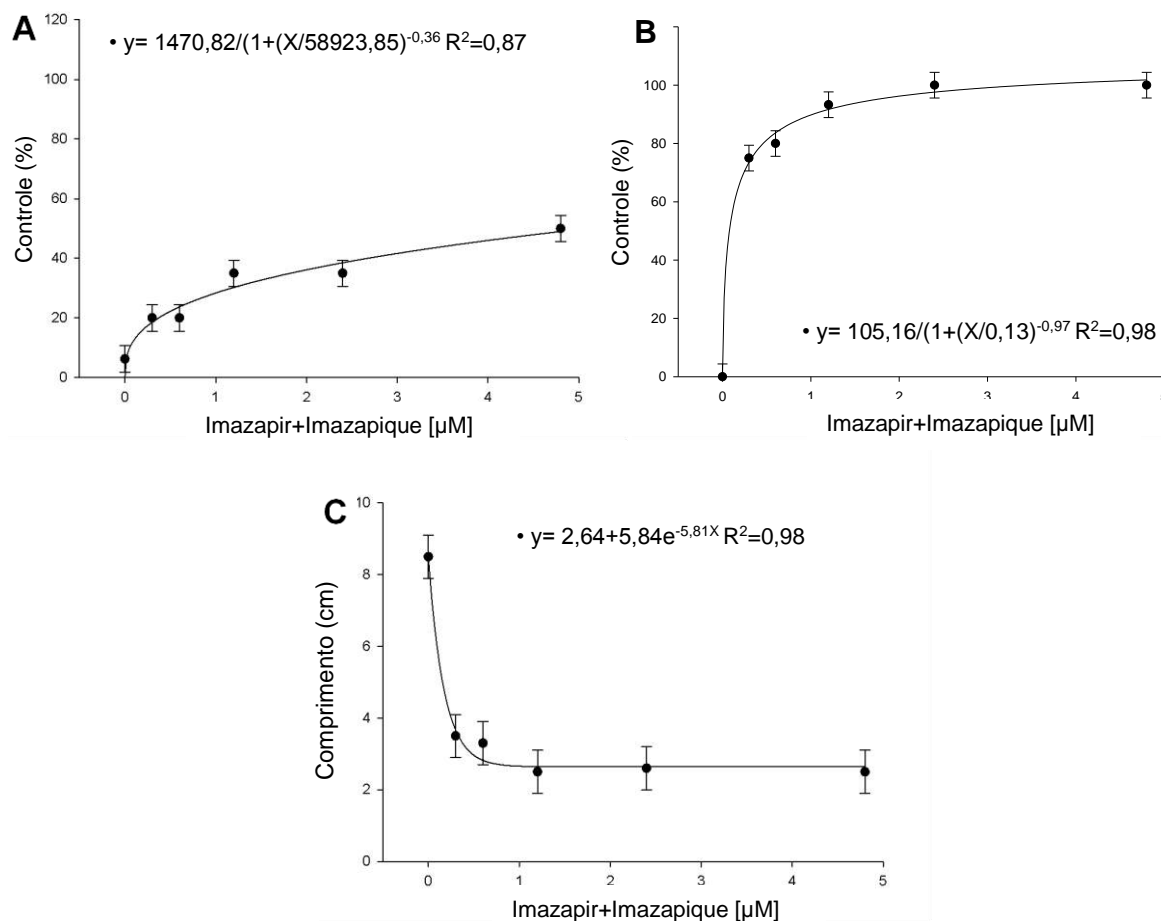


Figura 8 - Controle visual (%) de explantes de arroz daninho suscetível ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e comprimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2018. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

Com base em testes de resistência em monocotiledôneas, com uso de concentrações de herbicidas adicionadas no cultivo de afillhos de *Echinochloa* spp. (MATZENBACHER et al., 2013), foram observados que as concentrações para o controle destas espécies encontravam-se no intervalo entre 0,1 e 1 μ M. No presente estudo, buscou-se obter a concentração de herbicida em μ M, adicionada ao meio de cultura para obter o controle mais próximo do valor de controle numa situação de aplicação da dose recomendada a campo (“concentração eficiente”). Portanto, a concentração determinada como sendo a “eficiente” foi 1,3 μ M, obtida pelos parâmetros da equação de acordo com a segunda época de avaliação, que foi testada juntamente com as demais concentrações para os dois biótipos no segundo ensaio de curva de dose resposta.

No segundo ensaio, verificou-se interação entre os fatores biótipo e concentração do herbicida para todas as variáveis. O modelo que melhor se ajustou ao controle foi o de regressão exponencial em ambas épocas de avaliação, sendo que os valores de R^2 variaram de 0,96 a 0,99 e 0,91 a 0,92 para os biótipos suscetível e resistente, respectivamente (Figura 9A e B). Para a variável crescimento, o modelo que se ajustou foi o exponencial de três parâmetros com valores de R^2 de 0,94 a 0,99 demonstrando ajuste satisfatório dos dados aos modelos (Figura 9C).

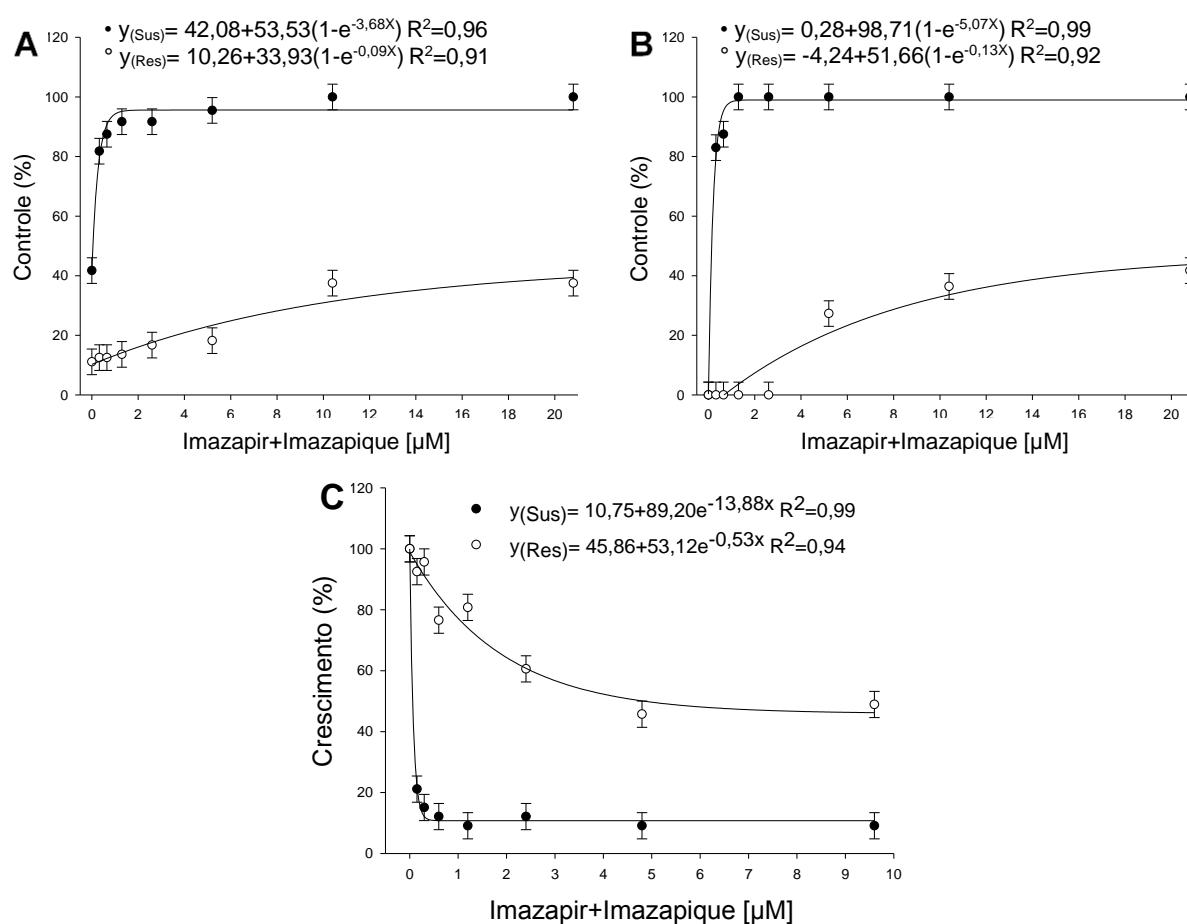


Figura 9 - Controle visual (%) de explantes de arroz daninho suscetível (Sus) e resistente (Res) ao imazapir+imazapique, em função de diferentes concentrações do herbicida aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação dos tratamentos (DAI) e crescimento da parte aérea dos explantes (C) aos 10 DAI. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2018. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro.

As equações construídas com os valores de controle, em resposta às concentrações crescentes do herbicida imazapir+imazapique, comprovam que os biótipos de arroz daninho suscetível e resistente respondem de modo diferente ao herbicida no teste in vitro, nas duas épocas de avaliação.

Aos cinco DAI para o biótipo suscetível, observou-se controle superior a 87% no intervalo de concentrações de 0,65 μ M a 20,8 μ M sendo que estas não diferiram entre si. Para o biótipo resistente, na mesma época, o intervalo de concentrações de 0 a 5,2 μ M apresentou valores de controle máximo em torno de 18%, não diferindo entre si pelo intervalo de confiança (Figura 9A). Cabe ressaltar que nesta época de avaliação, os afilhos se encontram ainda em desenvolvimento inicial podendo, num mesmo tratamento, apresentar crescimento desuniforme ou ausente nos primeiros 5 dias, o que explica os valores de controle observados nas testemunhas de 41,7% para o suscetível e 11,1% para o resistente, mesmo na ausência de herbicida (Figura 9A).

Apenas aos dez DAI foi observado maior crescimento das duas testemunhas (controle 0%), o que evidencia melhor desenvolvimento dos explantes nesta época de avaliação (Figura 9B). Nesta mesma época, observou-se controle de 100% para o biótipo suscetível a partir da concentração 1,3 μ M, sendo que esta mesma resultou em 0% de controle do biótipo resistente (Figura 9B). Verificou-se que o biótipo resistente apresentou 0% de controle no intervalo de concentrações de 0 a 2,6 μ M, sendo esta última, correspondente a 2 vezes o valor da concentração eficiente. Ademais, os valores máximos de controle observados para o biótipo resistente foram de 27,3; 36,4 e 41,7% para as concentrações 5,2; 10,4 e 20,8 μ M, não diferindo entre si (Figura 9B). Em ambas épocas de avaliação, não foi possível determinar a concentração necessária para o controle de 50% do biótipo resistente, uma vez que os limites das curvas convergem para 44,19 e 47,42 na primeira e segunda avaliações, respectivamente (Figura 9A e B).

Em testes de resistência a herbicidas inibidores da ALS com uso de cultivares de arroz resistentes, suscetíveis e arroz daninho, por embebição de sementes em solução de herbicida, foi observado que as melhores concentrações para discriminação dos biótipos, estavam entre 0,001 e 0,1mM de imazetapir+imazapique, equivalentes a 1 e 100 μ M (ROSO; MEROTTO JR.; DELATORRE, 2010). No mesmo trabalho, foram testadas plantas resistentes e suscetíveis na fase de plântula e afilhamento, onde as concentrações necessárias para diferenciar planta suscetível de resistente foram em torno de 4mM (4000 μ M) para plântula e 3mM (3000 μ M) para os afilhos (ROSO; MEROTTO JR.; DELATORRE, 2010). Cabe ressaltar que, no referido estudo, as plantas utilizadas

receberam a concentração de herbicida por interceptação radicular o que pode ter resultado em concentrações muito superiores a 1,3 μ M para confirmação de sua resistência.

Para a variável crescimento observou-se inibição a partir da concentração 0,325 μ M, para o biótipo suscetível, sendo que a testemunha apresentou a maior média de crescimento (100%) diferindo dos demais tratamentos (Figura 9C). Para o biótipo resistente não foi observada a mesma inibição no crescimento, apenas diminuição gradativa de acordo com o aumento das concentrações (Figura 9C). As maiores médias de crescimento foram observadas com 0,325 e 0,65 μ M, não diferindo da testemunha. Neste mesmo biótipo, a partir da concentração 10,4 μ M, foi observada diminuição em torno de 65% no crescimento dos explantes, sendo que os tratamentos 10,4 e 20,8 μ M apresentaram as menores médias, não diferindo entre si (Figura 9C).

Ao comparar os diferentes biótipos em cada concentração, observa-se significância em todo o intervalo de concentrações, em ambas épocas e nos valores de crescimento (Tabela 8). O que significa que, pelo teste t, os biótipos podem ser discriminados já na primeira concentração (0,325 μ M) e primeira época de avaliação, embora esta não atinja controle de 95% do biótipo suscetível, como se espera com uso de imazapir+imazapique para controle de arroz daninho, conforme recomendações técnicas da cultura do arroz irrigado (RECOMENDAÇÕES, 2016).

Tabela 8 - Controle visual (%) de explantes de arroz daninho suscetível (Sus) e resistente (Res) ao Imazapir+Imazapique em diferentes concentrações do herbicida aos 5 e 10 DAI e crescimento da parte aérea dos explantes aos 10 DAI. FAEM/UFPeL, Capão do Leão/RS, 2018.

Concentração (μ M)	Controle (%)				Crescimento (%)	
	5 DAI ¹		10 DAI ¹		Sus	Res
	Sus	Res	Sus	Res		
0,0	41,7 *	11,1	00,0 ^{ns}	00,0	100,0 ^{ns}	100,0
0,325	81,8 *	12,5	83,3 *	00,0	21,2 *	92,5
0,65	87,5 *	12,5	87,5 *	00,0	15,1 *	95,7
1,3	91,7 *	13,6	100,0 *	00,0	12,1 *	76,6
2,6	91,7 *	16,7	100,0 *	00,0	9,1 *	80,8
5,2	95,5 *	18,2	100,0 *	27,3	12,1 *	60,6
10,4	100,0 *	37,5	100,0 *	36,4	9,1 *	45,7
20,8	100,0 *	37,5	100,0 *	41,7	9,1 *	48,9
C.V. (%)	43,3		37,6		7,6	

¹ Dias após a inoculação; ^{ns} não significativo e * significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) na mesma linha, dentro de cada época de avaliação.

Para melhor eficiência do teste, a obtenção da resposta ainda aos cinco dias após a inoculação, é de grande importância, pois quanto mais tempo a planta daninha convive com a cultura, maior é o prejuízo na produtividade da lavoura. É também de extrema importância o tempo necessário para a tomada de decisão ao efetuar ou não um controle alternativo. No caso de plantas daninhas monocotiledôneas como o arroz daninho, dez dias representa um período prolongado, no qual a planta pode rebrotar, retomar seu crescimento podendo não ser mais controlada pelas medidas alternativas, e assim, sobrevivendo e reinfestando a área novamente.

Neste ensaio, para a segunda época de avaliação, a concentração de 1,3 μ M foi discriminadora do comportamento diferencial entre biótipos, pois resultou em elevada eficiência de controle do biótipo suscetível (100%) e nível de controle zero do biótipo resistente. Mesmo com a utilização de concentrações 16 vezes superiores à concentração eficiente, os níveis máximos de controle do biótipo resistente atingiram apenas 41,7% (Figura 9B). O baixo nível de controle do biótipo resistente pode estar relacionado a limitação das concentrações utilizadas no ensaio. Sugere-se, portanto, que mecanismo de resistência do biótipo estudado possa estar relacionado ao local de ação do herbicida (mutação da enzima ALS).

O modo de ação primário de herbicidas inibidores da ALS consiste na inibição da síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina pela inibição desta enzima. Assim como outros eventos secundários como o acúmulo de 2-cetobutirato, interrupção da síntese protéica e transporte fotossintético, também são apontados como causa da morte da planta (TRANEL; WRIGHT, 2002). A ALS presente em monocotiledôneas é, naturalmente, sensível à inibição por esses herbicidas. Entretanto, algumas condições são recomendadas para que os herbicidas possam alcançar maior eficiência, como, por exemplo, a aplicação nos momentos em que as plantas apresentam elevada atividade metabólica (PEREIRA et al., 2011).

Em relação a aplicação do teste para outras espécies de plantas daninhas, com diferentes mecanismos de resistência e para diferentes herbicidas, deve-se considerar as particularidades de cada mecanismo de ação herbicida e das plantas daninhas também. O movimento que ocorre da molécula de herbicida do meio de cultivo para o sítio de ação dentro da planta, não sofre a interferência de barreiras

cuticulares no teste in vitro como acontece a campo. Portanto no campo podem haver casos de resistência onde a planta daninha possui absorção diminuída do herbicida e por isso se torna resistente. Neste caso de resistência, ela não seria imune ao herbicida no teste in vitro, já que este seria fornecido diretamente via sistema vascular. Portanto a absorção diminuída do herbicida é um mecanismo de resistência que não poderia ser aplicado a este teste. Deve-se atentar para o mecanismo de resistência que a planta apresenta para que o resultado do teste seja confiável, sendo que o mesmo tem eficiência para herbicidas sistêmicos e mecanismos de resistência que não envolvam baixa absorção do produto.

Estudos relacionados ao cultivo de plantas daninhas in vitro, com uso de herbicidas e sobre a sua translocação sob estas condições de cultivo, são limitados. Desse modo, torna-se útil que mais pesquisas sejam desenvolvidas nesta área, afim de ampliar a aplicação do teste para outras espécies de plantas daninhas e diferentes herbicidas. Essas informações são fundamentais para que alternativas de manejo do arroz daninho, como rotação de culturas e de herbicidas com diferentes mecanismos de ação possam ser planejadas de forma rápida e assim evitar a disseminação da resistência desta espécie.

4.4 Conclusões

A maioria dos biótipos testados é considerada resistente.

É possível detectar biótipos de arroz daninho resistente a herbicidas inibidores de ALS pelo método de cultivo in vitro.

A concentração necessária para controle satisfatório de plantas suscetíveis de arroz daninho cultivadas in vitro é 1,3 μ M de imazapir+imazapique, sendo possível nesta concentração, discriminar com eficiência os biótipos suscetível e resistente.

5. CONCLUSÕES

De todos os biótipos testados, um terço dos biótipos de picão-preto, de capim-arroz e a maioria dos biótipos de arroz daninho, são considerados resistentes.

O meio de cultivo que proporciona melhor crescimento de explantes de picão-preto é o meio MS 50%, sem o uso de regulador de crescimento. Para capim-arroz o melhor meio é o meio MS 50% com adição de benzilaminopurina.

O método de cultivo in vitro permite detectar com eficiência biótipos de picão-preto, capim-arroz e arroz daninho resistentes a herbicidas inibidores da ALS.

As concentrações que proporcionam controle satisfatório das plantas suscetíveis cultivadas in vitro, são 0,6 μ M de imazetapir, 0,9 e 1,3 μ M de imazapir+imazapique, para picão-preto, capim arroz e arroz daninho, respectivamente. Nestas concentrações, é possível discriminar com eficiência os biótipos suscetíveis e resistentes.

6. REFERÊNCIAS

- AGROFIT Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 26 mar. 2018.
- ANDRES, A. et al. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do Sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, p.221-226, 2007.
- ARGENTA, G. et al. Potencial de rendimento de grãos de milho em dois ambientes e cinco sistemas de produção. **Scientia Agraria**, v.4, p.27- 34, 2003.
- AROCKIASAMY, S.; IGNACIMUTHU, S. Regeneration of transgenic plants from two indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using shoot apex explants. **Plant Cell Reports**, v.26, p.1745-1753, 2007.
- BECKIE, H. et al. Acetolactate Synthase Inhibitor–resistant false cleavers (*Galium spurium*) in Western Canada. **Weed Technology**, v.26, p.151-155, 2012.
- BECKIE, H. et al. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, v.14, p.428–445, 2000.
- BURGOS, N. R. Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. **Weed Science**, v.63, p.152-165, 2015.
- CANTRELL, R. Arroz: por que é tão essencial para a segurança e estabilidade global. **Perspectivas Econômicas, publicação eletrônica do Departamento de Estado dos Estados Unidos**, v.7, p.22-25, 2002.
- CASTRO, P.R. de C. et al. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Ciências Exatas Terra, Ciências Agrônomicas e Engenharia**, v.13, p.25-29, 2007.
- CHAUHAN, B. S.; JOHNSON, D.E. Ecological studies on *Echinochloa crusgalli* and the implications for weed management in direct-seeded rice. **Crop Protection**, v.30, p.1385-1391, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: HRAC-BR, 2016. 262 p.

CONAB Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento.
Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_11_11_30_39_boletim_graos_janeiro_2017.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2018.

CONCENÇO, G. et al. Ciência das plantas daninhas: histórico, biologia, ecologia e fisiologia. In: **Aspectos da Biologia e Manejo das Plantas Daninhas**. 1.ed. São Carlos: Rima, 2014. p.01-35.

CONCENÇO, G. et al., Método rápido para detecção de resistência de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) ao quinclorac. **Planta Daninha**, v. 26, p. 429-437, 2008.

COOB, Andrew; READE, John. **Herbicides and plant physiology**. Newport: Wiley-Blackwell, 2010. 286p.

DELYE, C. et al. Variation in the gene encoding acetolactate-synthase in *Lolium* species and proactive detection of mutant, herbicide resistant alleles. **Weed Research**, v.49, p.326–336, 2009.

DELYE, C.; MATEJICEK, A.; GASQUEZ, J. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). **Pest Management Science**, v.58, p.474–478, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos: Embrapa Solos**, Brasília: Embrapa, 2013. 376 p.

FLECK, N. G.; VARGAS, L.; ROMAN, E.S. Manejo e controle de plantas daninhas em arroz irrigado. In: **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 251-321.

FLECK, N.G. et al., Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-daninho. **Planta Daninha**, v.26, p.101-111, 2008.

FRANKLIN, G. et al. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation**, v.50, p.111-119, 2006.

FURTADO, G.F. et al. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do girassol. **Revista Verde**, v.7, p.12-17, 2012.

GALON, L. et al. Estimativa das perdas de produtividade de grãos em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) pela interferência do capim-arroz (*Echinochloa* spp.). **Planta Daninha**, v.25, p.697-707, 2007.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Critérios para relatos oficiais estatísticos de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas. In: **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, 2009. p.91-101.

HAN, H. et al. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v.68, p.1164-1170, 2012.

HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 14 mar. 2018.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. 1. ed. New York: Macmillan, 1983. p.117-227.

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA A CULTURA DA SOJA NO RIO GRANDE DO SUL E EM SANTA CATARINA, SAFRAS 2016/2017 E 2017/2018 – UPF - UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO. In: **41ª Reunião Pesquisa de Soja da região sul**. Passo Fundo, RS, 2016. 127 p.

IRGA Instituto Rio Grandense do arroz irrigado: Anuário estatístico do arroz. Disponível em: <www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 23 jan. 2018.

JELENSKA, J. et al. Mitotic B-type cyclins are differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. **Plant Science**, v.150, p.29-39, 2000.

KAUNDUN, S.S. et al. Syngenta 'RISQ' test: a novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACCase and ALS inhibitor herbicides in grass weeds. **Weed research**, v.51, p.284-293, 2011.

KAUNDUN, S.S.; WINDASS, J.D. Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. **Weed Research**, v.46, p.34–39, 2006.

KISSMANN, K. G.; **Plantas infestantes e nocivas**. TOMO I. 3ª Ed. São Paulo: Basf Brasileira S. A., 2007. CD-ROM.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A.; BURGOS, N. R. Competitiveness of ALS inhibitors resistant and susceptible biotypes of greater beggarticks (*Bidens subalternans*). **Planta Daninha**, v.29, p.457-464, 2011.

LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, v.38, p.852-860, 2008.

- LIAKOPOULOS, G.; STAVRIANOKOU, S.; KARABOURNIOTIS, G. Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: Evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata. **Annals of Botany**, v.87, p.641-648, 2001.
- MARAMBE, B.; AMARASINGHE, L. Propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*), Seedling growth under different temperatures and control. **Weed Biology and Management**, v.2, p.194-199, 2002.
- MARSHALL R.; MOSS, S.R. Characterization and molecular basis of ALS inhibitor resistance in the grass weed *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research**, v.48, p.439-447, 2008.
- MATZENBACHER, F.O. et al. Rapid diagnosis of resistance to imidazolinone herbicides in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and control of resistant biotypes with alternative herbicides. **Planta Daninha**, v.31, p.645-656, 2013.
- MAXWELL, B. D.; ROUSH, M. L.; RADOSEVICH, J. R. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. **Weed Technology**, v.4, p.2-13, 1990.
- MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DIAS, C.T.S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v.18, p.419-425, 2000.
- MORGANTE, C.V.; LOMBARDI, S.P. **Hormônios vegetais e biotecnologia**. Piracicaba: Esalq, 2004. 13p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PEREIRA, M. R. R. et al. Respostas de plantas de *Eleusine indica* sob diferentes condições hídricas a herbicidas inibidores da ACCase. **Planta Daninha**, v.29, p.397-404, 2011.
- POWLES, S. B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, v.20, p.282-289, 2006.
- POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in Action: Plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.317-347, 2010.
- READE, J.P.; COBB, A.H. New, quick tests for herbicide resistance in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) based on increased glutathione S-transferase activity and abundance. **Pest Management Science**, v.58, p.26-32, 2002.

- RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS DA PESQUISA PARA O SUL DO BRASIL - SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. In: **XXXI Reunião técnica da cultura do arroz irrigado**. Bento Gonçalves, RS, 2016. 197p.
- REY, M. S. et al. Regeneração in vitro de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.15, p.23-29, 2009.
- ROSO, A.C.; MEROTTO JR., A.; DELATORRE, C.A. Bioensaios para diagnóstico da resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz. **Planta Daninha**, v.28, p.411-419, 2010.
- RUEEGG, W.T.; QUADRANTI, M.; ZOSCHKE, A. Herbicide research and development: challenges and opportunities. **Weed Research**, v.47, p.271-275, 2007.
- SANCHOTENE, D. M. et al. Manejo químico de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate na cultura da soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.15, p.77-84. 2008.
- SANTOS, Daniele Damian. **Controle de qualidade, análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Bidens pilosa* Linnaeus (Asteraceae)**.2015. 98f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Centro de Ciências Naturais e Exatas , Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- SANTOS, J.B.; CURY, J.P. Picão-preto: Uma planta daninha especial em solos tropicais. **Planta Daninha**, v.29, p.1159-1171, 2011.
- SEEFELDT, S. S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v.9, p.218-227, 1995.
- SILVA, A.F. et al. Interferência de plantas daninhas em diferentes densidades no crescimento da soja. **Planta Daninha**, v.27, p.75-84, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p.
- TRANDEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, p.700-712, 2002.
- TREZZI, M. M. et al. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da PROTOX e da ALS. **Planta Daninha**, v.29, p.901-912, 2011.
- VARGAS, L. et al. Resposta de biótipos de *Euphorbia heterophylla* a doses de glyphosate. **Planta Daninha**, v.29, p.1121-1128, 2011.
- VIDAL, R. A. et al. Resistência de *Eleusine indica* aos inibidores da ACCase. **Planta Daninha**, v.24, p.163-171, 2006.

VIEIRA, R. A. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, v.4, p.122-126, 2009.

YANG, C. et al. Identification of Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) resistant to haloxyfop using three different assay techniques. **Weed Science**, v.55, p.537–540, 2007.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART, C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends Plant Science**, v.12 p.6–13, 2007.

ZANDONÁ, Renan Ricardo. **Influência da temperatura no fluxo de emergência de plantas daninhas e no período de interferência, em diferentes épocas de semeadura da soja**. 2016. 130f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

VITA

Daniela Tessaro é filha de Altair Luis Tessaro e Odete Teresinha Dal Moro Tessaro. Nasceu em 13 de julho de 1992, no Município de Marau, Rio Grande do Sul. Formou-se pela Escola Estadual de Ensino Médio Anchieta em Marau/RS no ano de 2009. No ano de 2010 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), onde se graduou como Engenheira Agrônoma em 2016. No período de 2011 a 2015 desenvolveu atividades como estagiária e bolsista de Iniciação Científica (CNPq), atuando no Departamento de Fitossanidade. Em 2016, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, em Capão do Leão/RS.