

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HUDSON KAGUEYAMA TAKANO

Capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) resistente ao glyphosate no Brasil

Maringá-PR

2017

HUDSON KAGUEYAMA TAKANO

Capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) resistente ao glyphosate no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Junior.

Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Constantin

Maringá-PR

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

T136c Takano, Hudson Kagueyama
Capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) resistente
ao glyphosate no Brasil / Hudson Kagueyama Takano. -
- Maringá, 2017.
xii, 93 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira
Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Jamil Constantin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2017.

1. Enzima EPSPS. 2. Chiquimato - Capim pé-de-
galinha. 3. Capim pé-de-galinha - Glyphosate -
Mecanismo de resistência. 4. Capim pé-de-galinha -
Sequenciamento. 5. Sonda TaqMan®. 6. Herbicida -
Resistência. 7. Capim pé-de-galinha - Controle
químico. I. Oliveira Junior., Rubem Silvério de,
orient. II. Constantin, Jamil, coorient. III.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de
Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 632.954

AMMA-003408

FOLHA DE APROVAÇÃO

HUDSON KAGUEYAMA TAKANO

Capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) resistente ao glyphosate no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Jamil Constantin
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dr. Fernando Storniolo Adegas
EMBRAPA Soja

Dr. Ramiro Fernando Lopez Ovejero
Monsanto do Brasil

Aprovada em: 14 de Fevereiro de 2017.

Local da defesa: Anfiteatro NAPD, Bloco I-45, Universidade Estadual de Maringá – Campus Sede

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas que foram, são e sempre serão essenciais em todas as conquistas e sonhos alcançados em minha vida: meus pais Edson e Helena.

AGRADECIMENTOS

Os MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS destinam-se primeiramente à Deus por me proporcionar saúde e motivação para a conquista deste importante objetivo.

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos vividos: meu pai Edson, minha mãe Helena, meus irmãos André e Olívia, meus cunhados Joaquim e Gabrielle, e também meu sobrinho Gustavo.

À minha esposa Vanessa pelo amor e companheirismo sempre e em todos as circunstâncias.

À sociedade, à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e à CAPES pelo financiamento dos meus estudos durante todos estes anos.

Aos professores do Núcleo de Estudos Avançados em Ciência das Plantas Daninhas (NAPD/UEM), Rubem Silvério de Oliveira Jr e Jamil Constantin pelos ensinamentos científicos, pela orientação e amizade, e também a todo o grupo NAPD pelo auxílio na condução dos experimentos, trabalho, dedicação e amizade durante todos esses anos.

Aos meus amigos Guilherme, Antônio, Naiara, Hugo, Alexandre, Luiz, Denis, Fabiano, Eliezer, João Guilherme, Jethro, Rafael, Fellipe, Ricardo e Vanessa pelo auxílio e amizade durante o tempo de NAPD-UEM, bem como a todos os meus amigos verdadeiros que me apoiaram em todas as circunstâncias.

Ao Instituto Mato-Grossense do Algodão e ao pesquisador Leonardo Bitencourt Scoz por disponibilizar infraestrutura e apoio técnico para a realização de parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica de Plantas e ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da UEM pelo auxílio em infraestrutura necessária para a realização de parte das pesquisas deste trabalho.

Aos professores Maria de Fátima Pires Silva Machado, Claudete Aparecida Mangolin e Rogério Marchiosi pelo apoio técnico em parte das pesquisas deste trabalho.

À empresa Monsanto e ao pesquisador Ramiro Fernando Lopez Ovejero por viabilizarem o desenvolvimento de parte das pesquisas deste trabalho e também por participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao pesquisador Fernando Storniolo Adegas pela disposição para participar como membro da banca examinadora da defesa.

À secretária do PGA-UEM Érika Cristina Sato pelo apoio nos processos burocráticos do programa de pós-graduação em Agronomia.

EPÍGRAFE

*“O destino não é frequentemente
inevitável, mas sim, uma questão de escolha.*

*Quem faz escolha, é autor da sua própria
história, constrói seus caminhos e realiza os seus
próprios sonhos”*

Augusto Cury

BIOGRAFIA

HUDSON KAGUEYAMA TAKANO, filho de Edson Takano e Helena Eiko Kagueyama Takano, nasceu no município de Paranaíba, Estado do Paraná, aos 23 dias do mês de Julho do ano de 1992. Durante a infância e adolescência cresceu trabalhando com a agricultura, o que despertou o seu interesse por esta atividade.

Em fevereiro de 2010, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Estadual de Maringá – UEM. Durante todo o período de graduação participou de projetos de pesquisa na área da Ciência das Plantas Daninhas, sob a orientação dos Professores Rubem Silvério de Oliveira Jr e Jamil Constantin. Também realizou graduação sanduíche na Universidad Nacional de La Plata em um período de seis meses e foi estagiário do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA. No último ano de graduação foi estagiário da Estação experimental de Mogi Mirim da empresa Dow AgroSciences. Graduou-se em Agronomia em 30 de janeiro de 2015.

Em março de 2015, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia em nível de Mestrado, área de concentração em Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob orientação do professor Dr. Rubem Silvério de Oliveira Júnior e co-orientação do professor Dr. Jamil Constantin. Durante o período de mestrado, além de trabalhar no Núcleo de Estudos Avançados em Ciência das Plantas Daninhas (NAPD/UEM), teve a oportunidade de realizar pesquisas em outros laboratórios da própria UEM, como o Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular e o Laboratório de Bioquímica de Plantas. Também realizou parte das suas pesquisas no Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt) e foi aluno visitante da Colorado State University (CSU).

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1. Crescimento, desenvolvimento e produção de sementes de capim pé-de-galinha.....	7
Introdução	10
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	15
Conclusão.....	23
CAPÍTULO 2. Confirmação da resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha	26
Introdução	29
Material e Métodos	31
Resultados e Discussão	35
Conclusão.....	42
CAPÍTULO 3. Mecanismo de resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha	46
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados e Discussão	56
Conclusão.....	64
CAPÍTULO 4. Controle químico de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate.....	68
Introdução	71
Material e Métodos	73
Resultados e Discussão	78
Conclusão.....	88
CONCLUSÕES GERAIS	91
Anexo – Protocolo para extração de DNA	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estádio de desenvolvimento das plantas de capim pé-de-galinha em função do período de avaliação (em dias após a semeadura – DAS e dias após a emergência – DAE) e caracterização por meio da escala BBCH (Hess et al., 1997).....	16
Tabela 2. Coordenadas geográficas dos diferentes locais de coleta das populações de capim pé-de-galinha nas safras de 2013/2014 e de 2014/2015	32
Tabela 3. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca da parte aérea em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de capim pé-de-galinha em estágio de um perfilho (E1) (Safrá 2013/2014).....	36
Tabela 4. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca da parte aérea em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de capim pé-de-galinha para aplicações realizadas em estágio de um perfilho (E1) (Safrá 2014/2015)	37
Tabela 5. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca da parte aérea em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de capim pé-de-galinha para aplicações realizadas em estágio de quatro perfilhos (E2) (Safrá 2014/2015)	38
Tabela 6. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de capim pé-de-galinha para aplicações realizadas em estágio de um perfilho (E1).....	39
Tabela 7. Pares de <i>primers</i> testados nas diferentes populações de capim pé-de-galinha.....	53
Tabela 8. <i>Primers</i> e sondas TaqMan utilizadas para a genotipagem do SNP na posição 106 do gene da EPSPS em capim pé-de-galinha	55
Tabela 9. Parâmetros estimados do modelo de Streibig e fatores de resistência (FR) para % de controle ou redução da massa seca das populações suscetíveis (S) e resistentes (R), bem como as doses necessárias para proporcionar 50 ou 80% de controle ou redução de massa seca de capim pé-de-galinha	56
Tabela 10. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 1.....	74
Tabela 11. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 2.....	75
Tabela 12. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 3.....	76
Tabela 13. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 4.....	77
Tabela 14. Porcentagem de controle (%) e número de plantas emergidas por vaso (NP) de capim pé-de-galinha após a aplicação de herbicidas em pré-emergência, em três avaliações (DAA – dias após a aplicação)	78
Tabela 15. Porcentagem de controle de capim pé-de-galinha em dois estádios (E1 – 1 perfilho e E2 – 4 perfilhos) após a aplicação de herbicidas visando dessecação pré-plantio, em duas avaliações (DAA - dias após a aplicação)	80

Tabela 16. Porcentagem de controle de capim pé-de-galinha em dois estádios (E1 – 1 perfilho e E2 – 4 perfilhos) após a aplicação de diferentes herbicidas inibidores da ACCase isolados ou em associação com glyphosate (DAA – dias após a aplicação)	82
Tabela 17. Porcentagem de controle de capim pé-de-galinha em dois estádios (E1 – 1 perfilho e E2 – 4 perfilhos) após a aplicação de diferentes herbicidas em pós-emergência, utilizados na cultura do milho (DAA - dias após a aplicação).....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Massa seca de folhas – MSF (A), massa seca de colmos – MSC (B), massa seca de raízes – MSR (C) e massa seca total – MST (D) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha..... 17
- Figura 2. Número de perfilhos – NPER (A) e área foliar – AF (B) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha 18
- Figura 3. Alocação de biomassa nas diferentes partes da planta (%) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha. Massa seca de folhas – MSF, massa seca de colmo – MSC, massa seca de raízes – MSR e massa seca de inflorescências – MINF..... 19
- Figura 4. Taxa de crescimento absoluto - TCA (A) e taxa de crescimento relativo – TCR (B) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha..... 20
- Figura 5. Número de sementes por planta - NSEM (A) e taxa de assimilação líquida – TAL (B) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha..... 21
- Figura 6. Locais em que foram coletadas as populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate no Estado do Paraná 40
- Figura 7. Curva de calibração da concentração de chiquimato em função da área do pico na leitura do HPLC 52
- Figura 8. Sequência do gene da enzima EPSPS em capim pé-de-galinha, local de anelamento do primer 6 (sublinhado) e locais onde as mutações T102 e P106 são documentadas (negrito). (GenBank: KM078728.1). 54
- Figura 9. Porcentagem de controle (A) e massa seca da parte aérea (B) em função de doses crescentes de glyphosate aos 28 dias após a aplicação em populações suscetíveis e resistentes de capim pé-de-galinha 57
- Figura 10. Acúmulo de ácido chiquímico após a aplicação de duas doses de glyphosate (540 e 1440 g e.a. ha⁻¹) em plantas de capim pé-de-galinha resistentes e suscetíveis. 58
- Figura 11. Fragmento de 330 pb gerado pela amplificação do primer 6 em triplicata de plantas de capim pé-de-galinha suscetíveis (S1, S2 e S3) e resistentes (R1, R2 e R3) ao glyphosate 59
- Figura 12. Primeira repetição da análise HRM pela curva de *melting* gerada pelo primer 6 em 14 amostras de plantas resistentes e três amostras de plantas suscetíveis ao glyphosate. R - resistente; S – suscetível 60
- Figura 13. Segunda repetição da análise HRM pela curva de *melting* gerada pelo primer 6 em 3 amostras de plantas resistentes e três amostras de plantas suscetíveis ao glyphosate. R - resistente; S – suscetível 61
- Figura 14. Alinhamento do fragmento da EPSPS de *Arabidopsis thaliana* [GenBank: CAA29828.1]; população suscetível (S) e população resistente (R) de *Eleusine indica* da Malásia (AY157642 MS e AY157643 MR) e do Brasil (BS e BR). As bases em cinza representam a substituição do códon CCA para TCA na posição 106 em populações resistentes, o que resulta na mutação P106S responsável pelo mecanismo de resistência. . 62

Figura 15. Discriminação alélica de 300 plantas de capim pé-de-galinha. O alelo T representa os indivíduos com a mutação P106S, enquanto que o alelo C representa os indivíduos suscetíveis ao glyphosate 63

RESUMO GERAL

TAKANO, H.K., Universidade Estadual de Maringá (UEM), fevereiro de 2017, **Capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) resistente ao glyphosate no Brasil**. Orientador: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Constantin.

Após o advento das culturas geneticamente modificadas que apresentam resistência ao glyphosate, a utilização deste herbicida aumentou substancialmente. O uso inadequado do glyphosate levou a seleção de sete espécies de plantas daninhas resistentes a este herbicida no Brasil. Além destas, falhas de controle de capim pé-de-galinha têm sido observados em lavouras anuais do Oeste do Paraná. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi: a) avaliar o crescimento, desenvolvimento e produção de sementes desta espécie; b) confirmar a resistência de capim pé-de-galinha ao glyphosate; c) identificar o mecanismo que confere a tal característica; d) validar um marcador molecular para rápida detecção da resistência ao glyphosate em populações de capim pé-de-galinha; e) avaliar herbicidas alternativos para o controle de populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate. Inicialmente, foi realizado um estudo sobre a biologia da espécie avaliando o crescimento, o desenvolvimento e a produção de sementes de capim pé-de-galinha. Experimentos de dose-resposta ao glyphosate também foram realizados em populações de capim pé-de-galinha coletadas em áreas com histórico de aplicação deste herbicida. O mecanismo de resistência foi investigado por meio da avaliação do acúmulo de chiquimato nas plantas após a aplicação do herbicida, e também do sequenciamento de um fragmento do gene da EPSPS. Além disso, uma sonda TaqMan foi desenhada em função do SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*) no gene da EPSPS responsável pela resistência ao glyphosate, visando validar este marcador para rápida detecção de plantas resistentes. Por fim, foram avaliados diversos herbicidas em pré e pós-emergência para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate. Os resultados mostraram que o início do perfilhamento ocorre logo aos 9 dias após a emergência (DAE) e aos 38 DAE a planta inicia a fase de crescimento exponencial e a produção de sementes, o que aumenta sua capacidade de competição e disseminação de propágulos. Foi confirmada a resistência ao glyphosate em pelo menos duas populações de capim pé-de-galinha. O acúmulo de chiquimato nas plantas suscetíveis foi de até sete vezes maior que nas plantas resistentes após a aplicação de glyphosate. O mecanismo que confere a resistência está associado à uma alteração de uma prolina para uma serina na posição 106 (P106S). A sonda TaqMan® foi validada para a rápida detecção da resistência, apresentando reprodutibilidade e precisão. O

uso de herbicidas residuais para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate constitui uma ferramenta de extrema importância para o seu manejo efetivo. O estágio de aplicação é determinante para se obter eficácia em pós-emergência.

Palavras-chave: EPSPS, acúmulo de chiquimato, mecanismo de resistência, sequenciamento, sonda TaqMan[®], resistência de sítio de ação, controle químico.

GENERAL SUMMARY

TAKANO, H.K., State University of Maringá (UEM), February 2017, **Goosegrass (*Eleusine indica*) resistant to glyphosate in Brazil**. Advisor: Prof. PhD. Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Co-advisor: Prof. PhD. Jamil Constantin.

After the beginning of the Roundup Ready crops commercialization, the use of glyphosate has increased substantially. This led to the selection of up to seven glyphosate resistant weed species. In addition, goosegrass control failures have been observed in annual crops fields of the Western Paraná State. In this sense, the objectives of this dissertation were: a) to evaluate the growth, development and seed production of this species; b) to confirm glyphosate resistance in goosegrass from Brazil; c) to identify the mechanism of glyphosate resistance in this species; d) to validate a molecular marker for rapid detection of glyphosate resistant goosegrass populations; e) to evaluate alternative herbicides for glyphosate resistant goosegrass control. Initially, a biology study was carried out evaluating the growth, development and seed production of goosegrass. Dose-response experiments of glyphosate were also carried out with goosegrass populations collected in areas where plant survival after glyphosate application was observed. Subsequently, the mechanism of resistance was investigated through a shikimate accumulation assay in plants after glyphosate application. We also sequenced a 330-bp fragment of the EPSPS gene. In addition, a TaqMan probe was designed based on a SNP (Single Nucleotide Polimorphism) in the EPSPS gene responsible for glyphosate resistance in goosegrass. Finally, several pre and post-emergence herbicides were evaluated for controlling glyphosate resistant goosegrass. The results showed that the beginning of tillering occurs as early as 9 days after emergence (DAE) and at 38 DAE the plant initiates the exponential growth phase and seed production, which increases its capacity for competition and dissemination of propagules. Resistance to glyphosate was confirmed in at least two goosegrass populations. The shikimate accumulation in susceptible plants was up to seven times greater than in resistant plants after glyphosate application. The mechanism of resistance is associated with an amino acid mutation from a proline to a serine at 106 position (P106S). The TaqMan® probe has been validated for rapid detection of resistance, presenting reproducibility and precision. The use of residual herbicides for glyphosate-resistant goosegrass control constitutes a very important tool for effective management. The application timing is crucial for post-emergence efficacy.

Keywords: EPSPS enzyme, shikimate accumulation, mechanism of resistance, sequencing, TaqMan® probe, target site resistance, chemical control.

INTRODUÇÃO GERAL

Na safra 2016/17, os estados do Paraná e do Mato Grosso cultivaram juntos 24,1 milhões de hectares de grãos, o que corresponde a mais de 40% da área plantada no Brasil. O volume produzido por estes dois estados nesta safra foi de 94,4 milhões de toneladas (43% do total). No Estado do Mato Grosso, a resistência aos herbicidas inibidores da ACCase tem limitado o controle de capim pé-de-galinha desde o ano de 2006 em lavouras de algodão. Em áreas cultivadas com milho de segunda safra, o controle desta planta daninha também tem sido difícil. Estudos mostram que a interferência imposta pela presença de capim pé-de-galinha nas culturas do milho e algodão pode chegar a até 50%.

O uso de herbicidas é a principal ferramenta para o manejo de plantas daninhas nas culturas de interesse econômico. A elevada dependência e a utilização inadequada destes produtos constituem o motivo pelo qual a resistência a herbicidas, atualmente, é o tema mais relevante da pesquisa na área da Ciência das Plantas Daninhas.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas de acordo com a *Weed Science Society of America* (WSSA) é a capacidade herdável de um biótipo em sobreviver e se reproduzir após sua exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biótipo selvagem. O número de casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas no mundo tem apresentado aumento substancial, especialmente nos últimos anos. No Brasil, até o momento, existem 43 casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas, englobando espécies com resistência a um ou mais mecanismos de ação.

O glyphosate é o herbicida com maior volume de comercialização no mundo, sendo posicionado no manejo de plantas daninhas em diversas culturas. Os fatores que contribuem para a intensiva utilização do glyphosate estão relacionados ao baixo custo, ao amplo espectro de controle, ao caráter sistêmico, à baixa atividade residual, e às culturas geneticamente modificadas que toleram a sua aplicação em pós-emergência (*Roundup Ready* - RR®).

Historicamente, antes da legalização do cultivo da soja RR® no Brasil, apenas um caso de resistência a este herbicida havia sido relatado. Já a partir de 2005, quando foi criada a lei nacional de biossegurança, a qual possibilitou o cultivo de transgênicos no Brasil, novos relatos de resistência a glyphosate passaram a ser documentados, totalizando sete espécies até o presente momento. Mesmo com o aumento de casos de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, nas principais regiões produtoras de grãos do Brasil, a adoção de cultivos sucessivos de soja e milho (ambos RR®) tem levado ao aumento da frequência de uso de

glyphosate e, portanto, da pressão de seleção de plantas daninhas resistentes a este mecanismo.

Nos últimos anos, reclamações relacionadas às falhas de controle de capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) após a aplicação de glyphosate têm sido cada vez mais frequentes em lavouras do Oeste do Paraná. Possivelmente, tais falhas de controle possam estar relacionadas à seleção de populações dessa planta daninha resistentes ao glyphosate. Em países como Argentina, Bolívia, China, Colômbia, Costa Rica, Japão, Malásia e Estados Unidos já existem casos confirmados de populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate.

A identificação precoce de focos de populações resistentes permite o planejamento e a introdução rápida de alternativas de controle que sejam eficientes e adequadas. Além disso, a confirmação destes casos pode contribuir também na adoção de estratégias que possam limitar ou retardar a expansão das áreas infestadas por estas populações. A detecção precoce aliada à adoção de estratégias adequadas (físicas, químicas e/ou culturais) pode controlar ou pelo menos retardar os problemas de resistência às herbicidas nas lavouras.

CAPÍTULO 1

Crescimento, desenvolvimento e produção de sementes de capim pé-de-galinha

Crescimento, desenvolvimento e produção de sementes de capim pé-de-galinha

RESUMO: O capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) é uma das plantas daninhas mais importantes do mundo por estar presente em quase todos os continentes e por causa da resistência múltipla a herbicidas que alguns biótipos apresentam. O objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento, o desenvolvimento e a produção de sementes desta espécie, visando gerar informações sobre sua biologia que podem ser úteis para o seu manejo. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, durante maio a setembro de 2015. Dezesesseis amostragens foram realizadas durante o ciclo de desenvolvimento da planta: 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 87, 94, 101 e 108 dias após a emergência (DAE). As variáveis-resposta foram baseadas em área foliar e matéria seca de cada uma das partes da planta e no número de sementes produzidas por planta. Mais de 80% das sementes emergiram aos 12 DAE, o início do perfilhamento ocorreu aos 9 DAE, cada planta de capim pé-de-galinha produziu mais de 120 mil sementes, encerrando seu ciclo aos 120 DAE. Entre 38 e 43 DAE, a planta apresentou rápida emissão de novos perfilhos, acúmulo exponencial de massa seca total e aumento substancial da taxa de crescimento absoluto. Constatou altos valores de taxa de crescimento relativo nos estádios iniciais, o que caracteriza rápido crescimento inicial.

Palavras-chave: *Eleusine indica*, taxa de crescimento relativo, alocação de biomassa, biologia de plantas daninhas.

Growth, development and seed production of goosegrass

ABSTRACT: Goosegrass (*Eleusine indica*) is one of the five most problematic weeds in the world, because it is a worldwide problem and there are reports of multiple resistance to herbicides up to four mechanisms of action. The objective of this study was to evaluate the growth, development and seed production of goosegrass, in order to contribute to the biology and of this species, and consequently with its integrated management. A greenhouse experiment has done during May to September 2015. We have done 16 plant collects throughout the plant development cycle: 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 87, 94, 101 and 108 days after emergence (DAE). Growth analysis parameters (relative growth rate, absolute growth rate and net assimilation rate) were calculated from primary data (leaf area and dry mass of each part of the plant throughout its life cycle). Goosegrass required 12 days to emerge in 80%; tillering and seed production started at 9 and 38 DAE, respectively. On average, one single plant produced more than 120,000 seeds at 108 DAE. Between 38 and 43 DAE, there is a pronounced growth period, when tillering, total biomass and absolute growth rate increase substantially. Based on plant growth and morphology, management of goosegrass should be primarily before 38 DAE, due to exponential growth after that. It was observed high values of relative growth rate in the initial stages, which characterizes fast initial growth.

Keywords: *Eleusine indica*, relative growth rate, biomass allocation, weed biology

INTRODUÇÃO

Eleusine indica (L.) Gaertn, popularmente conhecida no Brasil como capim pé-de-galinha, é considerada como uma das cinco plantas daninhas mais problemáticas do mundo, sendo infestante de culturas anuais e perenes, hortaliças e beiras de estradas, podendo ser encontrada principalmente na África, na América e em regiões intertropicais da Ásia (Holm et al., 1977; Ismail et al., 2002; Mueller et al., 2011). Trata-se de uma espécie diploide, anual, autógama, apresenta mecanismo fotossintético do tipo C4, e pode produzir elevado número de sementes (Chauhan & Johnson, 2008; Jalaludin et al., 2010).

Diversos casos de resistência a herbicidas em capim pé-de-galinha têm ocorrido mundialmente. Até o momento, existem relatos de biótipos resistentes aos inibidores de mitose, inibidores de ALS, inibidores de ACCase, inibidores do fotossistema I e inibidores da EPSPs. Na Malásia, são descritos casos de resistência múltipla, em que as populações apresentam resistência aos inibidores da EPSPS e da ACCase, ou aos inibidores do fotossistema I e aos inibidores da GS-GOGAT, ou ainda, a estes quatro mecanismos de ação simultaneamente (Jalaludin et al., 2014; Heap, 2017). No Brasil, a dificuldade de controle de capim pé-de-galinha no campo está relacionada principalmente a aplicação de herbicidas em estágio inadequado e à resistência aos inibidores da ACCase (Vidal et al., 2006) e ao glyphosate (Takano et al., 2017).

Uma das principais ferramentas para o manejo da resistência a herbicidas é a implementação de medidas integradas de controle de plantas daninhas. No entanto, para possibilitar o uso de estratégias de controle, é fundamental conhecer os principais aspectos relacionados à biologia dessas plantas (Van Acker, 2009). Neste sentido, estudos sobre análise de crescimento de plantas daninhas têm sido realizados para algumas espécies que apresentam algum tipo de resistência a herbicidas (Carvalho et al., 2005; Machado et al., 2006).

A análise de crescimento de plantas constitui uma ferramenta analítica muito empregada na caracterização do seu desenvolvimento, baseando-se em dados de matéria seca e área foliar, resultantes da biomassa acumulada nos diferentes órgãos ao longo do seu ciclo (Poorter et al., 2012). Normalmente, as plantas que apresentam crescimento mais rápido e maior porte são as que possuem maior capacidade de competir por recursos do meio (Roush & Radosevich, 1985). Este tipo de análise detalhada de uma planta daninha permite também o planejamento de momentos de aplicação de herbicidas em fases em que estas são mais suscetíveis ou em que o potencial de translocação destes produtos é maior. No caso do capim

pé-de-galinha, plantas com mais de três perfilhos apresentam limitada absorção de herbicidas via foliar em função do acúmulo de cera epicuticular (Malpassi, 2006).

Considerando que capim pé-de-galinha constitui um problema global, e que a dificuldade de seu controle tem aumentado principalmente em função da resistência a herbicidas, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o crescimento, o desenvolvimento e quantificar a produção de sementes de capim pé-de-galinha, de modo a contribuir com o desenvolvimento de técnicas de manejo desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no município de Maringá-PR, durante o período de maio a setembro de 2015.

Inicialmente, foram coletadas sementes de capim pé-de-galinha de área agrícola na região de Maringá (23°20'55.93"S; 52°04'13.76"W), sendo retiradas sementes maduras de pelo menos 10 plantas aleatórias, armazenando-as em sacos de papel. Feito isso, um exemplar representativo de toda a população foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM), sendo identificado posteriormente como *Eleusine indica* (L.) Gaertn.

Logo após a coleta, uma semente de capim pé-de-galinha foi colocada para germinar em cada célula de bandejas plásticas de 0,70 mm de espessura, preenchidas com substrato de fibra de coco, dentro de câmara de germinação (BOD) com a configuração diária de 8 horas de luz a 35°C e 16 horas sem luz a 20°C, condições consideradas ideais para germinação (Ismail et al., 2002). O número de plantas obtidas nesta fase foi superior ao necessário para realizar o transplante, pois nem todas as sementes apresentaram germinação uniforme. Desta forma, as plantas mais uniformes foram selecionadas e transplantadas para os vasos (uma planta por vaso), que foi realizado aos 14 dias após a semeadura (DAS), quando as plântulas apresentavam uma folha.

As unidades experimentais foram constituídas de vasos com capacidade para 3,5 dm³, preenchidos com solo que apresentou as seguintes características: pH em água de 6,30; 3,68 cmol_c de H⁺ + Al⁺³ dm⁻³ de solo; 3,17 cmol_c dm⁻³ de Ca⁺²; 0,67 cmol_c dm⁻³ de Mg⁺²; 0,61 cmol_c dm⁻³ de K⁺; 47,60 mg dm⁻³ de P; 11,89 g dm⁻³ de C; 640 g kg⁻¹ de areia grossa; 50 g kg⁻¹ de areia fina; 20 g kg⁻¹ de silte; 290 g kg⁻¹ de argila e textura franco-argilo-arenosa. Antes do transplante, foi realizada adubação neste solo aplicando o equivalente a 200 kg ha⁻¹ de adubo formulado (10-10-10). Durante a condução do experimento, foi aplicada lâmina de irrigação equivalente à 7 mm dia⁻¹.

As coletas de plantas foram realizadas semanalmente em 16 datas durante o ciclo de desenvolvimento: 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 87, 94, 101 e 108 dias após a emergência (DAE). Em cada coleta, foi feita a caracterização do estágio de desenvolvimento de acordo com a escala BBCH. A data da emergência foi considerada como o dia em que aproximadamente 80% das plântulas emergiram completamente nas bandejas com substrato, aos 12 DAS (2 dias antes do transplante). O delineamento experimental utilizado foi o

inteiramente casualizado, com quatro repetições. Em cada avaliação, quatro plantas (repetições), foram aleatoriamente avaliadas de forma destrutiva. Cada planta foi retirada cuidadosamente do vaso e lavada em água corrente para retirada do solo remanescente nas raízes.

As variáveis analisadas inicialmente foram: área foliar (AF), por meio do medidor de área foliar modelo LICOR LI-3100 (LI-COR, inc., Lincoln, Nebraska, EUA), e estágio de desenvolvimento por meio da escala fenológica para plantas daninhas BBCH (Hess et al., 1997). Em seguida, o material amostrado foi seco em estufa a 65°C durante 72 horas, para que, após a secagem, fossem determinadas a massa seca de folhas (MSF), a massa seca de colmo (MSC), a massa seca das raízes (MSR) e a massa seca total (MST) das plantas.

Também foi avaliada a massa seca de inflorescência (MINF) e foi contado o número de racemos florais presentes em cada uma das plantas avaliadas, bem como o comprimento médio dessas estruturas, a partir da primeira avaliação após a emissão da primeira inflorescência (45 DAE). Em cada uma das datas de avaliação, para a estimativa do número total de sementes produzidas por planta, procedeu-se a contagem do número de sementes presentes em 10 mm de racemo, aleatoriamente, em 100 amostras, assim como proposto por Carvalho et al. (2005). Desta forma, foi possível estimar a quantidade de sementes produzidas, por meio do produto entre o número de sementes presentes em 10 mm de racemo, o comprimento médio dos racemos e o número de racemos por planta.

Em cada época de avaliação, com os valores de massa seca total (MST), foi possível calcular a taxa de crescimento absoluto (TCA), a partir da fórmula: $TCA = (MST_n - MST_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})$, em que MST_n e MST_{n-1} são as massas secas totais de duas amostras sucessivas e $(t_n - t_{n-1})$ são os dias decorridos entre essas duas avaliações. Também foi calculada a taxa de crescimento relativo (TCR), que expressa o crescimento da planta em um intervalo de tempo, considerando a biomassa seca acumulada no início desse intervalo, sendo calculada pela fórmula: $TCR = (\ln MST_n - \ln MST_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})$.

Por fim, calculou-se a taxa de assimilação líquida (TAL), que representa a taxa de fotossíntese líquida e é determinada pela relação entre a biomassa seca produzida por área foliar da planta, em um determinado intervalo de tempo, sendo calculada pela fórmula: $TAL = [(MST_n - MST_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})] \cdot [(\ln AF_n - \ln AF_{n-1}) / (AF_n - AF_{n-1})]$, em que AF_n é a área foliar da planta por ocasião da avaliação n; e AF_{n-1} é a área foliar da planta por ocasião da avaliação n-1. Todos os cálculos e as fórmulas utilizadas nestas variáveis foram seguidos de acordo com Portes & Castro Jr (1991), Hoffmann & Poorter (2002) e Poorter & Garnier (2007).

As variáveis quantitativas relacionadas ao crescimento da planta foram analisadas por meio da análise da variância e comparadas pelo teste F ($p < 0,05$). Para as variáveis que apresentaram significância, foram ajustados modelos de regressões lineares e não-lineares, levando em consideração a significância dos coeficientes estimados e também a explicação biológica para o fenômeno. Para os modelos não-lineares, adotou-se o modelo Logístico (1) e o Lorentzian (2):

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

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

Os parâmetros da equação são representados por y , que é a variável resposta, x é o número de dias acumulados e a , b , c e d são os parâmetros de ajuste da equação, de tal forma que a é o ponto mínimo obtido, b é a diferença entre o ponto máximo e o ponto mínimo, c é o número de dias que proporciona 50% de resposta da variável para o modelo (1) e 100% da resposta da variável para o modelo (2); e d é a declividade da curva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de capim pé-de-galinha apresentaram emergência superior a 80% nas condições diárias de temperatura e luminosidade a que foram submetidas (8 horas de luz a 35°C e 16 horas sem luz a 20°C). Trabalhos na literatura mostram que a flutuação térmica e luminosa é determinante para as sementes de capim pé-de-galinha, visto que a sua germinação é inferior a 10% sob temperaturas constantes entre 20 e 35°C, enquanto que se eleva para 99% em condições de alternância de temperatura às 16 horas a 20°C e 8 horas a 35°C (Nishimoto & MacCarty, 1997; Ismail et al., 2002).

Uma característica comum intrínseca das plantas daninhas é a sua capacidade de manter o potencial germinativo de suas sementes durante longo período de tempo após a dispersão. No presente trabalho, a emergência de 80% das sementes de capim pé-de-galinha ocorreu ao longo de 12 dias, que é um intervalo de tempo relativamente maior, quando comparado ao período normalmente requerido para a emergência de culturas anuais como a soja e o milho, que apresentam tempo médio de 5 e 7 DAS respectivamente (Viana et al., 2005; Schuab et al., 2006) (Tabela 1). Mesmo que a maioria das sementes germinarem antes de 12 dias, aquelas que germinaram antes deste período se tornam competitivas com a cultura, especialmente em áreas onde há elevada infestação no banco de sementes. Além disso, períodos de dispersão mais longos estão relacionados a uma das estratégias de adaptação de plantas daninhas no ambiente (Brighenti & Oliveira, 2011).

Tabela 1. Estádio de desenvolvimento das plantas de *Eleusine indica* em função do período de avaliação (em dias após a sementeira – DAS e dias após a emergência – DAE) e caracterização por meio da escala BBCH (Hess et al., 1997).

Data	DAS	DAE	Estádio de desenvolvimento	
			Caracterização*	Escala BBCH
28/maio	0	-	Sementeira	0
09/junho	12	0	Emergência	9
12/junho	14	2	1-2 folhas	12
16/junho	19	7	3 folhas	13
18/junho	21	9	4 folhas, 2 perfilhos	22
22/junho	25	13	4-5 folhas, 3 perfilhos	22
24/junho	27	15	4-5 folhas, 4 perfilhos	23
30/junho	33	21	5-6 folhas, 5 perfilhos	24
03/julho	36	24	6-7 folhas, 6 perfilhos, emborrachamento	25
08/julho	41	29	6-7 folhas, 7 perfilhos, emissão do pendão	27
17/julho	50	38	6-7 folhas, 11 perfilhos, pendoadado	59
22/julho	55	43	7 folhas, 15 perfilhos, pendoadado	61
24/julho	57	45	7 folhas, 16 perfilhos, pendoadado	65
31/julho	64	52	7 folhas, 31 perfilhos, pendoadado	67
07/agosto	71	59	7 folhas, 53 perfilhos, pendoadado	69
14/agosto	78	66	7 folhas, 85 perfilhos, pendoadado	71
21/agosto	85	73	7 folhas, 61 perfilhos, pendoadado	73
28/agosto	91	80	7 folhas, 64 perfilhos, pendoadado	75
04/setembro	99	87	7 folhas, 67 perfilhos, pendoadado	77
11/setembro	106	94	7 folhas, 69 perfilhos, pendoadado	79
18/setembro	113	101	7 folhas, 69 perfilhos, pendoadado	81
25/setembro	120	108	7 folhas, 69 perfilhos, pendoadado	90

*Número de folhas referente ao perfilho principal.

Inicialmente, o acúmulo de matéria seca total de capim pé-de-galinha ocorreu de forma lenta até 38 DAE (Figura 1). A partir daí se iniciou um período de aumento, seguindo uma tendência exponencial desta variável até o ponto de inflexão da curva, aos 53 DAE. O ponto de inflexão da curva indica que a planta deixa de apresentar aumento exponencial e passa a acumular menor massa seca ao longo do tempo. Para as folhas, colmos e raízes o acúmulo de matéria seca ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta ocorreu de forma semelhante. Normalmente, espécies de plantas que apresentam crescimento mais rápido possuem maior capacidade de competir por recursos do meio (Roush & Radosevich, 1985).

Com isso, infere-se que a partir dos 38 DAE, a capacidade de competição de capim pé-de-galinha com a cultura também aumenta, no entanto, vale destacar que em uma condição de convivência interespecífica, esse período de tempo pode ser distinto.

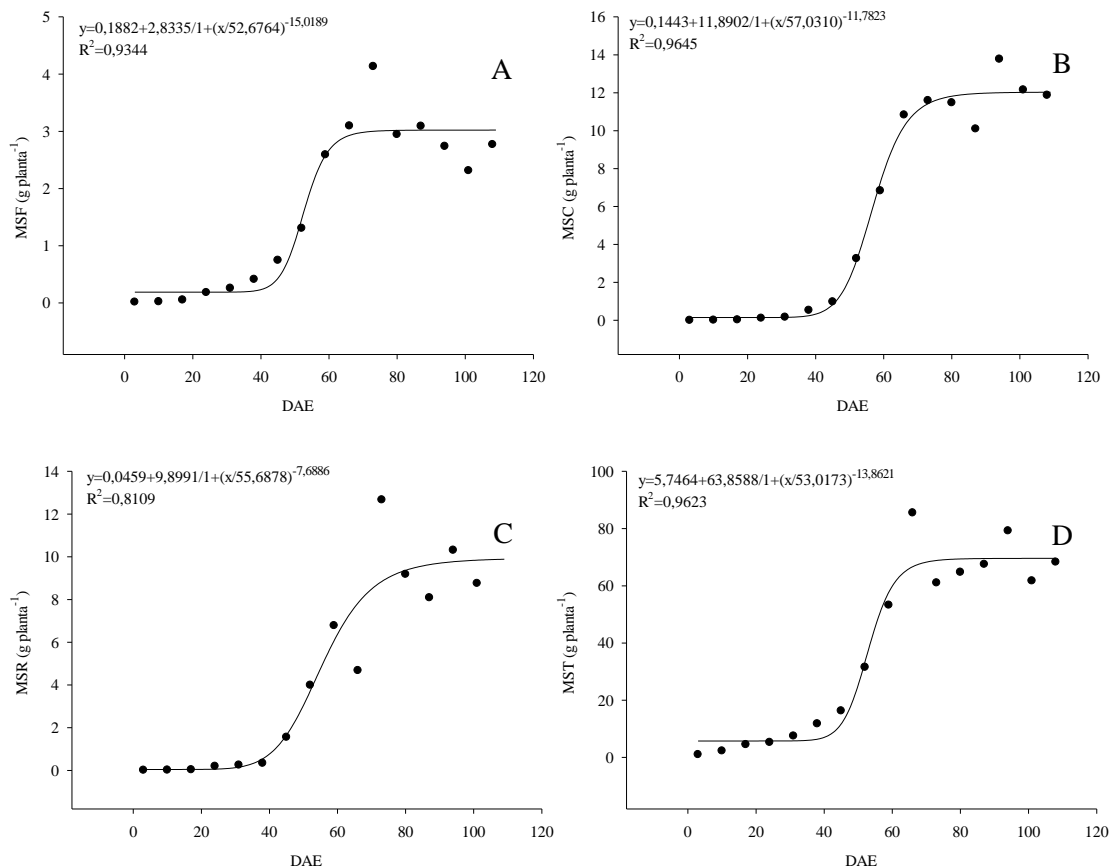


Figura 1. Massa seca de folhas – MSF (A), massa seca de colmos – MSC (B), massa seca de raízes – MSR (C) e massa seca total – MST (D) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha.

O início do perfilamento ocorreu logo após a emissão da terceira folha (9 DAE), no entanto. A partir daí, houve intenso perfilamento, que se estendeu até o ponto de inflexão da curva, aos 53 DAE. O número de perfilhos por planta se estabilizou somente aos 71 DAE, concomitantemente ao acúmulo de MST (Figura 2). Aos 76 DAE também foi possível observar a máxima área foliar, que até então, apresentava acréscimo exponencial, e que a partir deste ponto, é reduzida drasticamente.

O estágio de aplicação é determinante para se obter eficácia de herbicidas no controle de capim pé-de-galinha. A camada de cera sobre a cutícula das folhas de plantas com três perfilhos é de até 0,2 μm mais espessa que em plantas com apenas um perfilho (Malpassi,

2006). Uma vez que o herbicida precisa ultrapassar esta camada de cera para ser absorvido pela planta, a aplicação destes produtos em plantas de estágio com mais de três perfilhos torna a sua absorção bastante restrita. Portanto, a aplicação de herbicidas deve ser feita antes deste estágio, o qual foi atingido aos 13 DAE no presente trabalho.

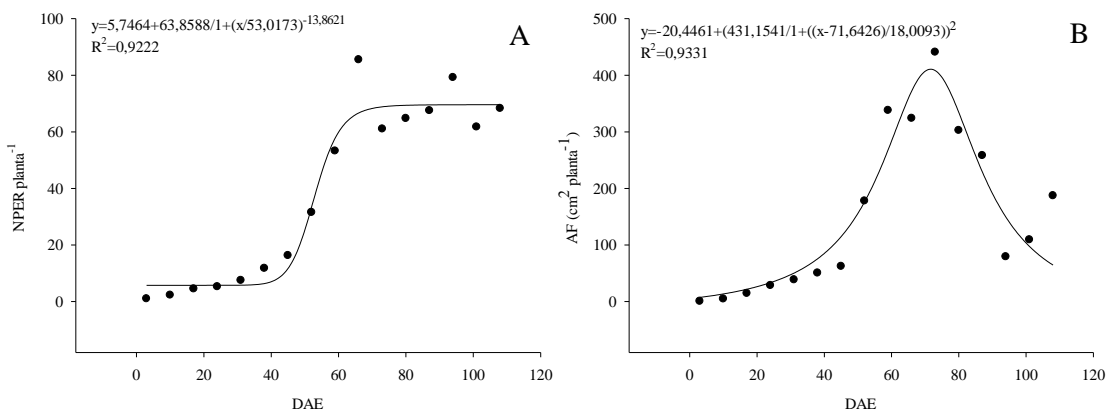


Figura 2. Número de perfilhos – NPER (A) e área foliar – AF (B) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha.

Ao comparar o crescimento de capim pé-de-galinha com outras plantas daninhas monocotiledôneas, diferentes comportamentos foram observados para *Digitaria insularis* e para *Chloris polydactyla*, as quais apresentam acúmulo de massa seca lento até por volta de 45 DAE. *C. polydactyla* inicia seu perfilhamento aos 30 DAE, e o início do florescimento ocorre somente aos 106 DAE. Já para *D. insularis*, o florescimento ocorre aos 70 DAE (Carvalho et al., 2005; Machado et al., 2006). Com base nesses fatores e no fato do capim pé-de-galinha apresentar rápida emissão de novos perfilhos, o seu ciclo de desenvolvimento é mais rápido que estas outras espécies, visto que se trata de uma espécie anual, com maior adaptabilidade em ambientes com alto nível de distúrbio, devido à sua capacidade de gerar novos indivíduos precocemente (Poorter & Garniner, 2007).

Com o decorrer do ciclo de desenvolvimento da planta, foram observadas variações na partição de biomassa para as folhas, os colmos, as raízes e as inflorescências (Figura 3). Inicialmente, 60% da massa total da planta era constituída de folhas e os 40% restantes eram de raízes. Aos 38 DAE, a alocação de biomassa entre folhas, colmos e raízes foi de 33, 40 e 27% respectivamente. A partir do início da emissão de inflorescências, aos 29 DAE, pôde-se observar que a participação da massa seca de folhas na massa seca total da planta é reduzida, devido à redução da sua área foliar decorrente do dreno de fotoassimilados para a produção de

sementes. A menor participação da massa seca de folhas em relação à massa seca total ao longo do tempo também torna a absorção de herbicidas menor, visto que estes produtos são absorvidos pela folha. Neste sentido, quanto menor o estágio da planta no momento da aplicação, maior será a sua eficácia sobre o capim pé-de-galinha.

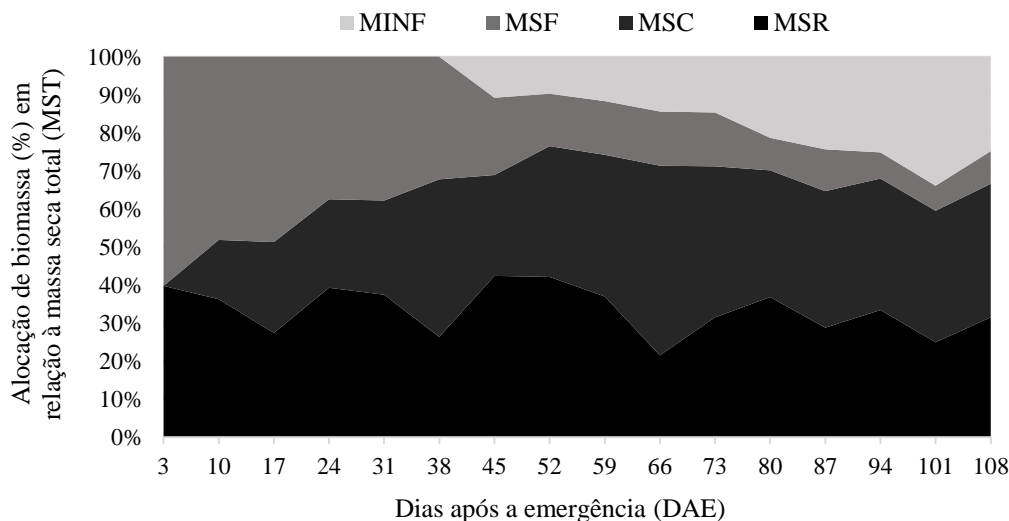


Figura 3. Alocação de biomassa nas diferentes partes da planta (%) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha. Massa seca de folhas – MSF, massa seca de colmo – MSC, massa seca de raízes – MSR e massa seca de inflorescências – MINF.

O modelo de regressão linear quadrática foi ajustado para a taxa de crescimento relativo (TCR) ao longo dos dias de ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha (Figura 4). Isso ocorre porque esta variável representa o acúmulo de matéria seca ao longo do tempo, considerando a biomassa pré-existente na planta, diferentemente da taxa de crescimento absoluto (TCA) (Poorter et al., 2012). Além disso, com o aumento da massa seca acumulada pelas plantas, há maior necessidade de fotoassimilados para a manutenção das estruturas já formadas, diminuindo a quantidade de energia disponível para o seu crescimento (Benincasa, 2003).

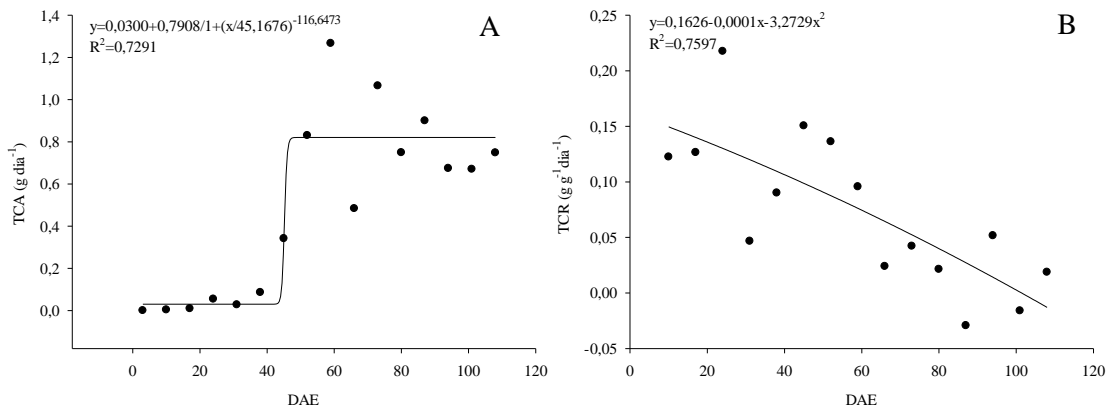


Figura 4. Taxa de crescimento absoluto - TCA (A) e taxa de crescimento relativo – TCR (B) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha.

A TCR máxima ocorreu aos 10 DAE, passando a decrescer com o passar dos dias, até atingir valores negativos no final do ciclo da planta. Já a TCA apresentou aumento substancial a partir de 43 DAE, concomitantemente ao aumento exponencial do acúmulo de biomassa total da planta. Os valores máximos de TCR e TCA foram da ordem de $0,15 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,82 \text{ g dia}^{-1}$, respectivamente. Estes valores se assemelham às taxas de crescimento de outras espécies de plantas daninhas C4, como *D. insularis* (Machado et al., 2006) e *Cyperus rotundus* (Brighenti et al., 1997), que apresentam TCR máxima variando entre $0,12$ e $0,14 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. A maior TCR observada nos estádios iniciais de crescimento do capim pé-de-galinha indica que o crescimento inicial desta planta daninha é rápido, o que está diretamente relacionado ao seu perfilhamento precoce (9 DAE).

Com o decréscimo de área foliar em função do dreno de fotoassimilados para a formação de sementes, a taxa de assimilação líquida também diminui, devido à limitação das principais estruturas responsáveis pela produção de fotoassimilados (folhas) (Figura 5). Nestas situações, a planta tende a alocar a biomassa em folhas, colmos e raízes de forma equilibrada para atender às necessidades fisiológicas e as funções desempenhadas por estes órgãos (Poorter et al., 2012).

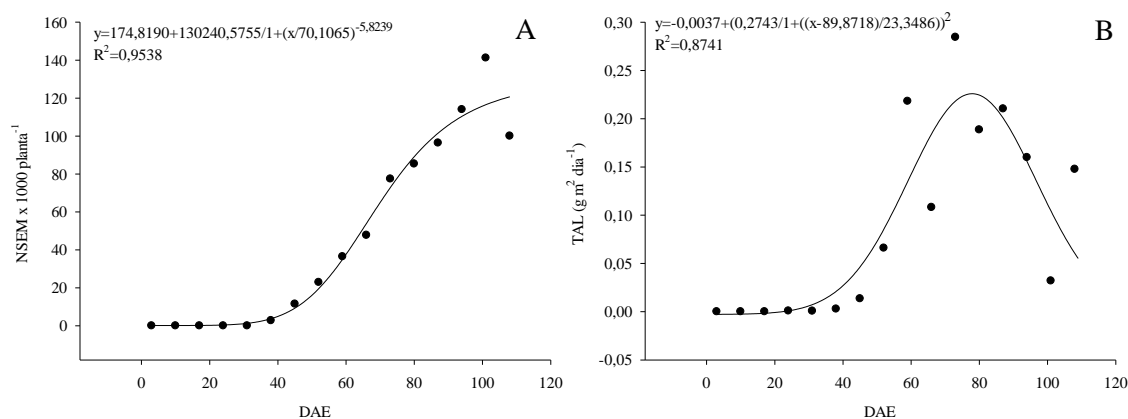


Figura 5. Número de sementes por planta - NSEM (A) e taxa de assimilação líquida – TAL (B) ao longo do ciclo de desenvolvimento do capim pé-de-galinha.

No presente trabalho, o início da produção de sementes de capim pé-de-galinha ocorreu aos 38 DAE, intervalo de tempo inferior ao ciclo de muitas culturas anuais. O número de sementes por planta aumentou de forma contínua até o final do período de avaliação, o que indica que a espécie produz sementes ao longo de um período de pelo menos 70 dias (38 a 108 DAE). A contínua produção de sementes implica na desuniformidade de maturação das mesmas, o que também constitui uma estratégia de sobrevivência. Em cultivos de grãos, caso o controle de plantas de capim pé-de-galinha seja ineficaz, estas serão capazes de produzir sementes antes do final do ciclo das culturas, o que significa que poderão estar aptas para dispersar seus propágulos pela colhedora de grãos, potencializando a sua capacidade de infestar novas áreas (Walsh & Powles, 2014).

O máximo valor de número de sementes ocorreu aos 108 DAE, quando esta espécie foi capaz de produzir mais de 120 mil sementes por planta (Figura 5). Neste sentido, práticas que impeçam a produção de sementes devem ser consideradas como um dos pontos-chave para um manejo sustentável do banco de sementes de capim pé-de-galinha nas lavouras (Chauhan & Johnson, 2010).

De forma geral, as culturas apresentam menor habilidade competitiva do que plantas daninhas, porém, na maioria dos casos, a alta densidade de plantas daninhas na área exerce elevada influência sobre o grau de interferência (Bianchi et al., 2006). No entanto, estudos de competição entre capim pé-de-galinha e culturas como a soja, demonstram habilidade competitiva semelhante entre a planta daninha e essas culturas (Wandscheer et al., 2013). Outro ponto importante é que os estudos sobre o custo da resistência ao glyphosate mostram que os biótipos de capim pé-de-galinha cujo mecanismo de resistência envolve um único

ponto de mutação na enzima EPSPS (P106S) apresentam a mesma habilidade competitiva que o biótipo suscetível (Yu et al., 2015).

O ciclo de capim pé-de-galinha foi considerado como encerrado aos 120 DAE, quando a planta iniciou o processo de senescência natural. Em condições de competição, diferentes resultados podem ser observados, pois as características fisiológicas normalmente são alteradas, resultando em diferenças no aproveitamento dos recursos do ambiente, principalmente no uso da água, que influencia de modo direto a disponibilidade de CO₂, a temperatura da folha e, conseqüentemente, a eficiência fotossintética da planta (Concenço et al., 2007).

Considerando que a partir de 38 DAE ocorre aumento exponencial do acúmulo de matéria seca, bem como elevados valores de TCA a partir de 43 DAE, a convivência desta planta daninha com espécies cultivadas, em situações que capim pé-de-galinha apresente estágio 59 BBCH (6-7 folhas, perfilhado e pendoado) ou acima disso, maiores prejuízos com interferência pode ser observados. Nesse sentido, é importante que o manejo de capim pé-de-galinha seja realizado antes que a planta atinja tal estágio. Além disso, o fato de o capim pé-de-galinha ser uma espécie que apresenta mecanismo fotossintético C₄, pode levar ao seu crescimento e desenvolvimento ser ainda mais acelerado em condições de temperaturas mais elevadas.

Uma vez que em muitas situações a principal opção de controle é a química, o manejo precoce de capim pé-de-galinha deveria ser adotado para evitar a mato-interferência inicial com as culturas. A eficiência de controle de capim pé-de-galinha mediante a utilização de herbicidas (glyphosate ou inibidores da ACCase) aplicados em pós-emergência é inversamente proporcional ao estágio de desenvolvimento, observando-se melhores níveis de eficácia com aplicações realizadas em estádios de até quatro folhas (Malpassi, 2006; Ulguim et al., 2013). No presente trabalho, o estágio de quatro folhas foi alcançado aos 9 DAE, o que indica que para se maximizar a chance de êxito destas aplicações em pós-emergência, as aplicações deveriam ser feitas antes ou no máximo quando as plantas de capim pé-de-galinha atingissem o estágio 22 BBCH (4 folhas, início do perfilhamento). A aplicação de herbicidas antes do perfilhamento é mais eficaz em função da menor deposição de cera na superfície cuticular da planta (Malpassi, 2006).

CONCLUSÃO

Nas condições em que se realizaram este trabalho, em regime de 8 horas de luz a 35°C e 16 horas na ausência de luz a 20°C diariamente, 80% das plântulas de capim pé-de-galinha emergiram até 12 DAE. O intervalo entre a emergência e o início do seu perfilhamento que ocorre logo após a emissão da quarta folha foi de apenas 9 dias, e o início da produção de sementes aos 38 dias. A planta encerrou o seu ciclo aos 120 DAE e produziu mais de 120 mil sementes por planta aos 108 DAE. Entre 38 e 43 DAE, a planta apresenta rápida emissão de novos perfilhos, acúmulo exponencial de massa seca total e aumento substancial da taxa de crescimento absoluto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas (Noções Básicas)**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.
- BIANCHI, M.A. et al. Proporção entre plantas de soja e plantas competidoras e as relações de interferência mútua. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1380-1387, 2006.
- BRIGHENTI, A.M. et al. Análise de crescimento da tiririca (*Cyperus rotundus* L.). **Revista Ceres**, v.44, n.251, p.94-110, 1997.
- BRIGHENTI, A.M.; OLIVEIRA, M.F. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p.1-36.
- CHAUHAN, B.S.; JOHNSON, D.E. Germination ecology of goosegrass (*Eleusine indica*): an important grass weed of rainfed rice. **Weed Science**, v.56, n.1, p.699-706, 2008.
- CHAUHAN, B.S.; JOHNSON, D.E. The role of seed ecology in improving weed management strategies in the tropics. **Advances in Agronomy**, v.105, p.221-262, 2010.
- CARVALHO, S.J.P. et al. Crescimento, desenvolvimento e produção de sementes da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*). **Planta Daninha**, v.23, n.4, p.603-609, 2005.
- CONCENÇO, G. et al. Uso da água em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) em condição de competição. **Planta Daninha**, v.25, n.3, p.449-455, 2007.
- HEAP, I. International survey of herbicide-resistant weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>> Acesso em: 27 de Janeiro de 2017.
- HESS, M. et al. Use of the extended BBCH scale - general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, v.37, n.6, p.433-441, 1997.
- HOFFMANN, W.A.; POORTER, H. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. **Annals of Botany**, v.90, n.1, p.37-42, 2002.
- HOLM, L.G. et al. **The world's worst weeds: distribution and biology**. Honolulu: University Press Hawaii, 1977. 609 p.
- ISMAIL, B.S. et al. Germination and seedling emergence of glyphosate-resistant and susceptible biotypes of goosegrass (*Eleusine indica* [L.] Gaertn.). **Weed Biology and Management**, v.2, n.4, p.177-185, 2002.
- JALALUDIN, A. et al. Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. **Weed Biology and Management**, v.10, n.4, p.256-260, 2010.
- JALALUDIN, A. et al. Multiple resistance across glufosinate, glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in an *Eleusine indica* population. **Weed Research**, v.55, n.1, p.82-89, 2014.
- MACHADO, A.F.L. et al. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.641-647, 2006.

- MALPASSI, R.N. Herbicide effects on cuticle ultrastructure in *Eleusine indica* and *Portulaca oleracea*. **Biocell**, v.30, n.1, p.51-56, 2006.
- MUELLER, T.C. Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennessee. **Weed Science**, v.59, n.4, p.562-566, 2011.
- NISHIMOTO, R.K.; MCCARTY, L.B. Fluctuating temperature and light influence seed germination of goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed Science**, v.45, n.3, p.426-429, 1997.
- POORTER, H.; GARNIER, E. Ecological Significance of inherent variation in relative growth rate and its components. In: **Functional Plant Ecology**, 2007, Boca Raton: CRC Press. p. 67-100.
- POORTER, H. et al. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. **New Phytologist**, v.193, n.1, p.30-50, 2012.
- PORTES, T.A.; CASTRO JUNIOR, L.G. Análise de crescimento de plantas: Um programa computacional auxiliar. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, n.1, p.53-60, 1991.
- ROUSH, M.L.; RADOSEVICH, S.R. Relationships between growth and competitiveness of four annual weeds. **Journal of Applied Ecology**, v.22, n.1, p.895-905, 1985.
- SCHUAB, S.R.P. et al. Potencial fisiológico de sementes de soja e sua relação com a emergência das plântulas em campo. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.4, p.553-561, 2006.
- TAKANO, H.K. et al. Goosegrass resistant to glyphosate in Brazil. **Planta Daninha**, v.36, e017163071, 2017.
- ULGUIM, A.R. et al. Manejo de capim pé-de-galinha em lavouras de soja transgênica resistente ao glifosato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.17-24, 2013.
- VAN ACKER, R.C. Weed biology serves practical weed management. **Weed Research**, v.49, n.1, p.1-5, 2009.
- VIANA, J.S. et al. Emergência e crescimento de plântulas de milho procedentes de sementes produzidas em sistemas de manejo de solo com e sem adubação mineral. **Revista Ciência Agronômica**, v.36, n.3, p.316-321, 2005.
- WALSH, M.J.; POWLES, S.B. High seed retention at maturity of annual weeds infesting crop fields highlights the potential for harvest weed seed control. **Weed Technology**, v.28, n.3, p.486-493, 2014.
- WANDSCHEER, A.C.D. et al. Competitividade de capim-pé-de-galinha com soja. **Ciência Rural**, v.43, n.12, p.2125-2131, 2013.
- YU, Q. et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**, v.167, n.4, p.1440-1447, 2015.

CAPÍTULO 2

Confirmação da resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha

Confirmação da resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha

RESUMO: Diversos casos de resistência de capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) têm sido reportados mundialmente. Relatos de falhas de controle pela aplicação de glyphosate têm sido cada vez mais frequentes especialmente na região Centro-Oeste do Paraná. O objetivo deste trabalho foi avaliar a existência de populações de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate. Para isso, 25 populações coletadas em duas safras consecutivas (2013/2014 e 2014/2015) foram semeadas e cultivadas em casa-de-vegetação. Experimentos de curva dose-resposta de glyphosate foram realizados utilizando-se as doses 0, 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840, 7680 e 15360 g e.a. ha⁻¹. O estágio de aplicação foi de um perfilho (E1) para as populações de 2013/2014 e E1 e quatro perfilhos (E2) para as populações de 2014/2015. Além disso, três das populações consideradas como supostamente resistentes nestes experimentos (populações 7, 19 e 25), tiveram suas gerações F1 submetidas ao ensaio de dose-resposta do herbicida visando verificar se a resistência era herdada. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que as populações 19 e 25, oriundas de Campo Mourão e Luiziana (Centro-Oeste do Estado do Paraná) constituem o primeiro relato de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate no Brasil (FR=3,99-6,81), atendendo a todos os critérios estabelecidos para confirmação de novos casos de resistência. O estágio de um perfilho é o mais adequado para o estudo de dose-resposta de glyphosate.

Palavras-chave: *Eleusine indica*, dose resposta, estágio de aplicação, fator de resistência

Confirmation of glyphosate resistance in goosegrass

ABSTRACT: Several cases of herbicide resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) have been reported worldwide. In Brazil, control failures complaints have been increasingly frequent, especially in Midwest of Parana State. The objective of this study was to evaluate the possibility of glyphosate resistance in goosegrass according to all the criteria for confirmation of new weed resistance cases. For this, 25 populations were collected in two consecutive seasons (2013/2014 and 2014/2015), seeded and grown in greenhouse. Random plants had their species identified in herbarium. Glyphosate dose-response experiments were carried out using the following doses: 0, 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840, 7680 and 15360 g a.e. ha⁻¹. The application timing was one tiller (E1) for the populations from 2013/2014 and E1 and four tillers (E2) for the populations from 2014/2015. Three of all populations were considered as supposedly resistant in these experiments (population 7, 19 and 25) had their F1 generations subjected to herbicide dose-response in order to verify the heritability of resistance. The heritability was confirmed only for the population 19 and 25. The results obtained in this study concluded that the populations 19 and 25, from Campo Mourão and Luiziana (Midwest of Paraná State) are the first report of goosegrass resistant to glyphosate in Brazil (FR = 3.99 to 6.81), following all the criteria for confirmation of new resistance cases. The application timing of one tiller is more appropriate for dose-response experiments.

Keywords: *Eleusine indica*, dose response, application timing, resistance factor

INTRODUÇÃO

A resistência de plantas daninhas a herbicidas constitui um dos principais desafios da agricultura mundial, especialmente nos últimos anos em que o número de casos de espécies resistentes aumentou substancialmente. Atualmente existem 43 casos de resistência a herbicidas no Brasil, dentre os quais, sete são espécies resistentes ao glyphosate, sendo elas, *Lolium perenne ssp. multiflorum*, *Conyza bonariensis*, *C. canadensis*, *C. sumatrensis*, *Digitaria insularis*, *Chloris elata* e *Amaranthus palmeri* (Carvalho et al., 2011; Heap, 2017).

Para que uma população de determinada planta daninha seja considerada como um novo caso de resistência, esta deve atender os seguintes critérios: 1. Sobreviver e se reproduzir à uma dose do herbicida normalmente letal à população selvagem; 2. Confirmação por meio de resultados obtidos por protocolos com base científica; 3. A resistência deve ser herdável para as gerações subsequentes; 4. O problema deve ter impacto prático no campo; 5. Identificação botânica da espécie da planta daninha em análise (Heap, 2005; Cristoffoleti & Lopez-Ovejero, 2008).

O capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) é considerado uma das plantas daninhas mais problemáticas, sendo encontrada em muitas regiões do mundo. Apresenta rápido crescimento, autogamia, ciclo C4 e elevada produção de sementes (mais de 120.000 planta⁻¹), as quais são disseminadas pelo vento (Kissmann e Groth, 1997; Mueller et al., 2011; Takano et al., 2016).

O primeiro relato de resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha ocorreu em 1997, em pomares da Malásia (Lee e Ngim, 2000). A partir daí populações resistentes foram encontradas em diversos continentes ao redor do mundo (Yuan et al., 2005; Kaundun et al., 2008; Mueller et al., 2011; Molin et al., 2013; Heap, 2017). Além da resistência ao glyphosate, algumas populações de capim pé-de-galinha podem apresentar resistência a até quatro mecanismos de ação simultaneamente (EPSPS, ACCase, Fotossistema I e GS-GOGAT) (Jalaludin et al., 2014).

Apesar de não serem relatadas populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate no Brasil, populações com baixo nível de resistência já foram detectadas no Rio Grande do Sul (Vargas et al., 2013). Mesmo sendo importante para o meio científico, este tipo de resistência tem baixo impacto prático no campo, uma vez que a dose de recomendação é normalmente letal para essas populações. No entanto, diversos técnicos e produtores da região Centro Oeste do Estado do Paraná têm observado plantas de capim pé-de-galinha

sobrevivendo à aplicação de glyphosate em suas lavouras. A partir deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a existência de populações de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes capim pé-de-galinha foram coletadas nas safras de 2013/2014 e 2014/2015 em áreas com histórico de aplicações de glyphosate e cultivadas em sistema de sucessão soja/milho, cujo cultivo de soja, em todos os casos, era com cultivares Roundup Ready®. Nestas áreas, a coleta foi realizada em pelo menos 10 plantas aleatórias não controladas pela aplicação de glyphosate em pós-emergência da soja, formando um *bulk*.

Na safra de 2013/2014, as coletas foram realizadas em 13 localidades dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Goiás. Neste mesmo ano, uma população sabidamente suscetível foi coletada e utilizada como padrão. Em função dos resultados obtidos no primeiro ano, na safra de 2014/2015, procedeu-se à coleta somente no Estado do Paraná, em 12 localidades. Cada local foi considerado uma população distinta de capim pé-de-galinha e o período de coleta compreendeu os meses de janeiro e fevereiro de 2014 e de 2015 (Tabela 2). As plantas de capim pé-de-galinha em estágio reprodutivo tiveram a espécie identificada pelo Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM) como *Eleusine indica* (Linn.) Gaertn., família Poaceae (Nº de protocolo: HUEM 30031).

Tabela 2. Coordenadas geográficas dos diferentes locais de coleta das populações de *Eleusine indica* nas safras de 2013/2014 e de 2014/2015.

População	Safra	Coordenadas	Cidade	Estado
Suscetível	2014	S 23°19'35" O 52°00'05"	Mandaguaçu	PR
1	2014	S 24°27'24" O 54°16'16"	Marechal Cândido Rondon	PR
2	2014	S 24°20'42" O 53°24'57"	Jesuítas	PR
3	2014	S 23°51'10" O 52°11'29"	Quinta do Sol	PR
4	2014	S 24°20'34" O 52°33'25"	Mamborê	PR
5	2014	S 24°13'25" O 52°56'27"	Goioerê	PR
6	2014	S 23°19'11" O 51°18'54"	Rolândia	PR
7	2014	S 24°04'59" O 53°11'18"	Goioerê	PR
8	2014	S 18°46'37" O 52°37'02"	Chapadão do Céu	GO
9	2014	S 26°23'22" O 52°48'45"	São Lourenço do Oeste	SC
10	2014	S 24°12'59" O 52°57'46"	Campo Mourão	PR
11	2014	S 24°18'39" O 52°43'16"	Juranda	PR
12	2014	S 24°12'46" O 52°48'32"	Boa Esperança	PR
13	2014	S 24°06'27" O 52°51'25"	Campo Mourão	PR
14	2015	S 24°04'11" O 52°52'51"	Moreira Sales	PR
15	2015	S 24°13'44" O 52°50'53"	Goioerê	PR
16	2015	S 24°14'06" O 52°52'22"	Boa Esperança	PR
17	2015	S 24°01'52" O 52°49'27"	Janiópolis	PR
18	2015	S 24°02'27" O 52°52'33"	Janiópolis	PR
19	2015	S 24°09'29" O 52°29'04"	Campo Mourão	PR
20	2015	S 24°07'12" O 53°13'37"	Mariluz	PR
21	2015	S 24°01'52" O 52°49'07"	Janiópolis	PR
22	2015	S 24°02'42" O 52°27'55"	Campo Mourão	PR
23	2015	S 24°08'19" O 52°28'50"	Campo Mourão	PR
24	2015	S 24°13'51" O 52°52'31"	Rancho Alegre	PR
25	2015	S 24°13'09" O 52°18'05"	Luiziana	PR

A dose de registro recomendada de glyphosate para controle de capim pé-de-galinha varia entre 720 e 1200 g e.a. ha⁻¹ em mais de 80% das marcas comerciais deste herbicida (Rodrigues & Almeida, 2011; MAPA, 2016), sendo este, a faixa de doses normalmente utilizado pela maioria dos produtores desta região. Além disso, diversos trabalhos na literatura reportam que a aplicação de 840 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate proporciona controle de capim pé-de-galinha acima de 96% (Corbett et al., 2004; Thomas et al., 2006; Clewis et al., 2006). Por isso, considerou-se o valor médio de recomendação como dose de referência para o ajuste da curva dose resposta (960 g e.a. ha⁻¹).

Para confirmar a resistência em protocolo de base científica, foram realizados três experimentos. O Experimento 1 foi feito para as 14 populações de 2013/2014, o Experimento 2 para as 13 populações de 2014/2015 e o Experimento 3 para a geração F1 das populações 7, 19 e 25. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os experimentos 1 e 3 foram dispostos em esquema fatorial duplo, sendo o primeiro fator composto pelas diferentes populações e o segundo fator por 10 doses de glyphosate (0, 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840, 7680 e 15360 g e.a. ha⁻¹). Já o Experimento 2, em esquema fatorial triplo sendo o primeiro fator composto pelas diferentes populações, o segundo fator pelas mesmas 10 doses de glyphosate e o terceiro fator de dois estádios de aplicação.

Em todos experimentos, as unidades experimentais foram compostas por vasos de 1 dm³, os quais foram preenchidos até a metade com solo que apresentava valores de pH em água de 5,9; 11,89 g dm⁻³ de C; 720 g kg⁻¹ de areia; 20 g kg⁻¹ de silte e 260 g kg⁻¹ de argila. Acima desta camada de solo, as unidades experimentais foram preenchidas com substrato de fibra de coco, visando a impedir a emergência de possíveis sementes de plantas daninhas presentes no solo utilizado.

Foram semeadas 30 sementes de cada população por vaso, e após a emergência foi realizado desbaste, mantendo-se três plântulas por unidade experimental. Para as populações de 2013/2014, o estádio das plantas no momento da aplicação era de um perfilho por planta, com três folhas e 4 cm de altura (E1). Já para as populações de 2014/2015, além do E1, também foram avaliadas plantas em estádio de quatro perfilhos e 13 cm de altura. Plantas sobreviventes das populações 7, 19 e 25 foram cultivadas separadamente, e suas sementes foram coletadas para constituir as respectivas gerações F1. As doses do herbicida e o estádio de aplicação foram os mesmos utilizados para o Experimento 1.

As aplicações foram realizadas com pulverizador costal pressurizado por CO₂, munido de barra de 1,5 m de comprimento, contendo três pontas de pulverização do tipo AI 110.02 (0,5 m entre pontas), com pressão de 2,5 kgf cm⁻², proporcionando volume de aplicação equivalente a 200 L ha⁻¹. As aplicações foram realizadas sempre no período da manhã em condições climáticas adequadas.

Foram avaliados a porcentagem de controle (escala visual de 0 a 100%) aos 28 DAA, em que 0% representa a ausência de injúrias e 100% a morte das plantas. Ao final deste período, também foi determinada a massa seca da parte aérea, por meio da coleta da parte aérea das plantas sobreviventes à aplicação e posterior secagem em estufa à 65°C por 72 horas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, ajustando-se ao modelo de regressão não-linear logístico, proposto por Streibig (1988):

$$y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]}$$

Em que: y é o controle percentual ou massa seca da parte aérea; x é a dose do herbicida (g e.a. ha⁻¹) e a , b e c são os parâmetros estimados da equação, de tal forma que: a é amplitude existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável; b é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e c é a declividade da curva ao redor de b .

Um dos termos integrantes da equação do modelo logístico (b) é uma estimativa do valor de C_{50} ou de GR_{50} , que representam a dose do herbicida necessária para o controle ou redução da massa seca das plantas em 50% (Christoffoleti, 2002). Embora um dos parâmetros do modelo logístico seja uma estimativa do valor de C_{50} , optou-se também por realizar seu cálculo matemático por meio da equação inversa, conforme discussão proposta por Carvalho et al. (2005):

$$x = b \left(\left| \frac{a}{y} - 1 \right| \right)^{\frac{1}{c}}$$

Além dos valores de C_{50} ou GR_{50} obteve-se também, por meio da equação inversa, os valores de C_{80} e GR_{80} . A estimativa desses valores é importante do ponto de vista prático, pois representa a dose necessária para atingir níveis mínimos de controle considerados como aceitáveis no campo. Baseado nos valores de C_{50} e GR_{50} , foi calculado o fator de resistência ($FR = C_{50}$ ou GR_{50} da população supostamente resistente / C_{50} ou GR_{50} da população suscetível) para as populações resistentes. O fator de resistência expressa o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% da população resistente é superior à dose que controla 50% da população suscetível (Hall et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância dos dados mostrou que houve significância para as fontes de variação, bem como para a interação entre populações e doses. Houve ajuste adequado do modelo para os dados de controle e de massa seca da parte aérea, sendo definidos os parâmetros a , b e c da equação log-logística. Os valores de R^2 foram próximos de 1,0, indicando adequado ajuste do modelo em relação aos dados observados. A partir dos modelos ajustados foi possível calcular para os dados de controle e de massa seca da parte aérea, as doses necessárias para controle de 50% e 80% de cada população avaliada.

Para a variável controle na safra de 2013/2014, com exceção da população 8, todas as populações apresentaram $FR > 1,0$ (Tabela 3). Entretanto, na maioria delas, a dose de glyphosate necessária para controle ou redução da massa seca em 80% foi menor do que a dose recomendada para controle da espécie. Por outro lado, as populações 5 e 7 apresentaram C_{80} de 1217,73 e 1443,01 g e.a. ha^{-1} e GR_{80} de 1102,74 e 1248,20, respectivamente, o que é maior que a dose média recomendada para a espécie. Nestes casos em que a dose recomendada não proporcionou controle satisfatório, o FR variou entre 4,16 e 7,99. Para a população suscetível, a massa seca da parte aérea foi reduzida em 80% com 172,18 g e.a. ha^{-1} de glyphosate.

Tabela 3. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca da parte aérea em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de *Eleusine indica* em estágio de um perfilho (E1) (Safrá 2013/2014).

População	g e.a. ha ⁻¹					
	C ₅₀	C ₈₀	FR	GR ₅₀	GR ₈₀	FR
<i>Suscetível</i>	100,45	150,78	-	100,97	172,18	-
1	194,94	284,24	1,94	152,39	353,92	1,51
2	278,15	389,06	2,77	110,99	235,05	1,10
3	154,12	212,92	1,53	99,74	216,45	0,99
4	162,26	249,62	1,62	133,23	322,51	1,32
5	604,72	1217,73	6,02	420,34	1102,74	4,16
6	117,08	164,61	1,17	61,05	118,89	0,60
7	802,43	1443,01	7,99	726,13	1248,20	7,19
8	88,32	140,71	0,88	59,62	122,28	0,59
9	248,35	393,99	2,47	225,16	348,26	2,23
10	276,01	402,30	2,75	81,31	260,33	0,81
11	105,11	142,72	1,05	61,59	114,68	0,61
12	313,98	479,52	3,12	167,25	375,21	1,66
13	179,71	258,01	1,79	103,38	168,22	1,02

C₅₀ ou C₈₀: dose necessária para controlar a população em 50% e 80%; GR₅₀ ou GR₈₀: dose necessária para reduzir a massa seca da parte aérea da população em 50 e 80%; FR₅₀: fator de resistência (C₅₀ ou GR₅₀ da população resistente / C₅₀ ou GR₅₀ da população suscetível).

Na safra de 2014/2015, para o primeiro estágio (E1), com base nos resultados de C₅₀ e GR₅₀, todas as populações apresentaram FR>1,0 (Tabela 4). Os valores de C₈₀ e GR₈₀ foram maiores do que a dose de recomendada somente para as populações 19 e 25. No caso da população 19, o valor de GR₈₀ foi o maior entre todas as demais populações (1653,49 g e.a. ha⁻¹).

Tabela 4. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca da parte aérea em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de *Eleusine indica* para aplicações realizadas em estágio de um perfilho (E1) (Safrá 2014/2015).

População	g e.a. ha ⁻¹					
	C ₅₀	C ₈₀	FR	GR ₅₀	GR ₈₀	FR
<i>Suscetível</i>	113,26	204,39	-	101,14	240,22	-
14	299,43	504,80	2,64	178,45	387,66	1,76
15	273,31	419,75	2,41	155,58	341,76	1,54
16	397,20	797,43	3,51	298,28	609,01	2,95
17	367,13	629,17	3,24	444,80	688,38	4,40
18	363,66	650,49	3,21	305,72	519,79	3,02
19	503,49	1571,42	4,45	503,41	1653,49	4,98
20	320,95	620,41	2,83	277,55	873,90	2,74
21	239,14	444,47	2,11	137,88	310,16	1,36
22	267,72	428,39	2,56	249,82	495,75	2,47
23	289,94	554,91	2,36	313,94	708,92	3,10
24	320,63	594,91	2,83	107,54	222,77	1,06
25	536,54	1471,71	4,74	552,02	1524,49	5,46

C₅₀ ou C₈₀: dose necessária para controlar a população em 50% e 80%; GR₅₀ ou GR₈₀: dose necessária para reduzir a massa seca da parte aérea da população em 50 e 80%; FR₅₀: fator de resistência (C₅₀ ou GR₅₀ da população resistente / C₅₀ ou GR₅₀ da população suscetível).

Os resultados obtidos para as populações avaliadas na Safrá 2014/15 que receberam aplicação em estágio E2 evidenciaram menor suscetibilidade ao glyphosate em todas as populações comparadas com o estágio E1 (Tabela 5). Com exceção das populações 23 e 24, os valores de C₈₀ e GR₈₀ de todas as populações foi maior que 960 g e.a. ha⁻¹. Isto mostra a importância do estágio de desenvolvimento das plantas no momento da aplicação, o que pode estar colaborando com as falhas de aplicação observadas no campo.

Tabela 5. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca da parte aérea em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de *Eleusine indica* para aplicações realizadas em estágio de quatro perfilhos (E2) (Safrá 2014/2015).

População	g e.a. ha ⁻¹					
	C ₅₀	C ₈₀	FR	GR ₅₀	GR ₈₀	FR
<i>Suscetível</i>	190,31	478,18	-	120,67	298,42	-
14	546,29	1412,49	2,87	397,07	969,40	3,29
15	782,83	1734,77	4,11	259,56	1059,55	2,15
16	624,54	1727,47	3,28	219,76	1029,19	1,82
17	843,13	2137,20	4,43	444,80	1878,16	3,69
18	630,48	1508,86	3,31	469,14	1352,47	3,88
19	978,04	2451,96	5,14	648,21	1943,56	5,37
20	713,05	1873,06	3,75	397,84	1519,33	3,30
21	712,11	1796,25	3,74	466,63	1421,12	3,87
22	832,80	1900,60	3,72	401,87	1008,55	3,33
23	507,87	767,01	2,67	383,29	729,57	3,18
24	430,59	793,04	2,26	281,63	582,66	2,33
25	784,95	2575,59	4,12	511,20	1856,07	4,24

C₅₀ ou C₈₀: dose necessária para controlar a população em 50% e 80%; GR₅₀ ou GR₈₀: dose necessária para reduzir a massa seca da parte aérea da população em 50 e 80%; FR₅₀: fator de resistência (C₅₀ ou GR₅₀ da população resistente / C₅₀ ou GR₅₀ da população suscetível).

Aplicações de glyphosate em capim pé-de-galinha em estágio de desenvolvimento precoce (E1) normalmente implica em maior eficácia pois é o momento de maior suscetibilidade dessas plantas aos herbicidas (Malpassi, 2006; Ulguim et al., 2013). A eficácia de herbicidas sobre capim pé-de-galinha com mais de três perfilhos deve-se ao acúmulo de cera na superfície foliar da planta, o que diminui a absorção do produto pela planta (Malpassi, 2006).

Uma das características de capim pé-de-galinha é a rápida capacidade de perfilhamento, visto que o estágio de um perfilho e de quatro perfilhos pode ser atingido aos nove e aos quinze dias após a sua emergência (DAE), respectivamente (Takano et al., 2016). O rápido crescimento desta espécie sugere que, por questões operacionais, as aplicações no campo nem sempre possam ser realizadas em estágio adequado para o seu controle.

Apesar disso, todas as populações apresentaram maiores valores de C₅₀ ou GR₅₀ do que a população suscetível. As populações 7, 19 e 25 apresentaram valores de C₈₀ e de GR₈₀ maiores do que a dose máxima de glyphosate recomendada para o controle de capim pé-de-

galinha, enquanto que a população suscetível foi controlada em 80% com 478,18 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate. Os fatores de resistência nestas três populações variaram de 3,69 a 5,37.

Os resultados obtidos para a geração F1 das populações 7, 19 e 25 mostraram que a resistência não foi herdada em todas as populações (Tabela 6). No caso da população 7, o FR foi maior que 1,0, porém os valores de C₈₀ e GR₈₀ foram abaixo da dose recomendada (653,27 e 647,27 g e.a. ha⁻¹, respectivamente), não atendendo, para esta população, o critério de herdabilidade da resistência. Por outro lado, os valores destes parâmetros foram acima de 1200 g e.a. ha⁻¹ para as populações 19 e 25 e os fatores de resistência variaram de 3,99 a 6,81, atendendo nestas populações o critério de herdabilidade.

Tabela 6. Doses estimadas de glyphosate para controle e redução de massa seca em 50 e 80% e respectivos fatores de resistência de diferentes populações de *Eleusine indica* para aplicações realizadas em estágio de um perfilho (E1).

População	(g e.a. ha ⁻¹)					
	C ₅₀	C ₈₀	FR	GR ₅₀	GR ₈₀	FR
<i>Suscetível</i>	113,26		-	100,14		-
7 - F1	419,68	653,27	3,71	397,78	647,27	3,97
19 - F1	573,76	1290,77	5,07	399,59	1407,04	3,99
25 - F1	554,65	1268,62	4,90	681,86	1554,95	6,81

C₅₀ ou C₈₀: dose necessária para controlar a população em 50% e 80%; GR₅₀ ou GR₈₀: dose necessária para reduzir a massa seca da parte aérea da população em 50 e 80%; FR₅₀: fator de resistência (C₅₀ ou GR₅₀ da população resistente / C₅₀ ou GR₅₀ da população suscetível). F1: representa a descendência ou geração F1 da referida população.

A população de capim pé-de-galinha do Rio Grande do Sul caracterizada como de baixo nível de resistência ao glyphosate apresentou fator de resistência de 1,1 (Vargas et al., 2013). Já os fatores de resistência obtidos para as populações 19 e 25 no presente trabalho (FR=3,9-6,8) são mais semelhantes aos relatos de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate no Tennessee-EUA (FR=3,1-7,4) (Mueller et al., 2011) e na Malásia (FR=8-12) (Lee e Ngim, 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as populações 19 e 25 atendem a todos os critérios descritos para a confirmação de um caso de resistência por Heap (2005) (Figura 6). Critério 1: as plantas dessas populações sobreviveram e se reproduziram após sua exposição a uma dose de herbicida que foi letal para a população suscetível; Critério 2: os fatores de resistência foram maiores que um (FR=3,9-6,8) e a dose recomendada para a

espécie não proporcionou controle satisfatório (C_{80} e $GR_{80} > 1200$ g e.a. ha^{-1}); Critério 3: as plantas da geração F1 dessas populações também foram consideradas resistentes; Critério 4: reclamações de falhas de controle estão sendo observadas no campo; Critério 5: plantas aleatórias dessas populações foram devidamente classificadas como *Eleusine indica*.

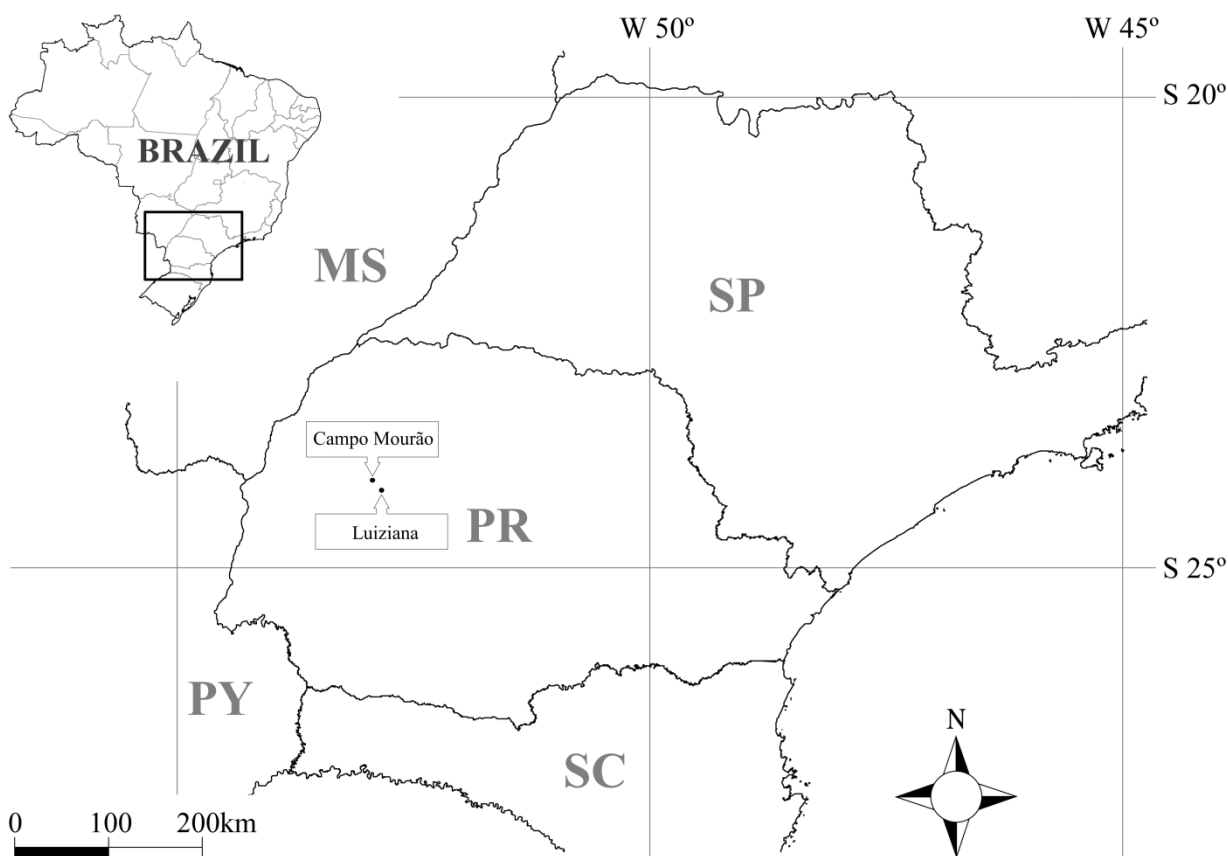


Figura 6. Locais em que foram confirmadas as duas populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate no Estado do Paraná.

Neste sentido, medidas complementares de manejo com herbicidas devem ser planejadas para reduzir a pressão de seleção, tais como a associação e a utilização de herbicidas com mecanismos de ação diferentes (Shaner, 2000; Johnson e Gibson, 2006). Trabalhos de pesquisa mostram que os herbicidas inibidores da ACCase constituem uma das alternativas para o controle de capim pé-de-galinha (Ulguim et al., 2013). No entanto, é importante lembrar que já foi relatada resistência de capim pé-de-galinha a este mecanismo de ação no Brasil (Vidal et al., 2006), o que demonstra que a aplicação contínua de graminicidas pode não ser eficaz em todas as situações. Alternativamente, outros mecanismos de ação podem apresentar eficácia no controle destas populações, tais como inibidores da GS-

GOGAT, inibidores da síntese de carotenoides (Ulguim et al., 2013), inibidores da divisão celular e inibidores do fotossistema I (Molin et al., 2013).

O mecanismo de resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha de outros países envolve substituição de uma prolina por serina ou treonina na posição 106 no gene da EPSPS (P106S ou P106T) (Baerson et al., 2002; Ng et al., 2004; Yu et al., 2007; Kaundun et al., 2008; Kaundun et al., 2011), ou ainda a amplificação do gene da EPSPS em plantas resistentes (Chen et al., 2015). Esse tipo de mutação simples confere níveis intermediários de resistência ao glyphosate ($FR < 10$). Entretanto, mutação dupla nas posições 106 (T102I e P106S) da população mutante pode conferir níveis mais elevados de resistência ($FR > 10$) (Yu et al., 2015). Apesar disso, o mecanismo que confere resistência em populações do Brasil ainda é desconhecido. Portanto, novos estudos visando elucidar o mecanismo que confere a resistência, bem como o desenvolvimento de novas ferramentas alternativas para o manejo das populações resistentes são necessários.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que as populações 19 e 25, oriundas de Campo Mourão e Luiziana (Centro-Oeste do Estado do Paraná) constituem o primeiro relato de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate no Brasil (FR=3,99-6,81), atendendo a todos os critérios estabelecidos para confirmação de novos casos de resistência. Plantas em estágio mais avançado (quatro perfilhos) apresentaram maiores valores de C_{50} e GR_{50} em função da menor suscetibilidade ao herbicida, sendo assim, o estágio de um perfilho é mais adequado para estudos de dose resposta nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAERSON, S.R. et al. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v.129, n.3, p.1265-1275, 2002.
- CARVALHO, S.J.P. et al. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, v.23, n.3, p.535-542, 2005.
- CARVALHO, L.B. et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v.59, n.2, p.171-176, 2011.
- CHEN, J. et al. Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). **Planta**, v.242, n.4, p.859-868, 2015.
- CLEWIS, S.B. et al. Weed management with S-metolachlor and glyphosate mixtures in glyphosate-resistant strip and conventional-tillage cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Weed Technology**, v.20, n.2, p.232-241, 2006.
- CORBETT, J.L. et al. Weed efficacy evaluations of bromoxynil, glufosinate, glyphosate and pyriithiobac and sulfosate. **Weed Technology**, v.18, n.3, p.443-453, 2004.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de populações resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.513-519, 2002.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J., editor. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.3-30.
- HALL, L.M. et al. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, v.46, n.4, p.390-396, 1998.
- HEAP, I. Criteria for Confirmation of Herbicide-Resistant Weeds - with specific emphasis on confirming low level resistance - 2005. Disponível em: <<http://weedscience.org/documents/resistancecriterion.pdf>> Acesso em: 27 de abril de 2016.
- HEAP, I. International survey of herbicide-resistant weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>> Acesso em: 27 de Janeiro de 2017.
- JALALUDIN, A. et al. Multiple resistance across glufosinate, glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in an *Eleusine indica* population. **Weed Research**. v.55, n.1, p.82-89, 2014.
- JOHNSON, W.G.; GIBSON, K.D. Glyphosate-resistant weeds and resistance management strategies: an Indiana grower perspective. **Weed Technology**, v.20, n.3, p.768-772, 2006.

- KAUNDUN, S.S. et al. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. **Weed Science**, v.56, n.5, p.637-646, 2008.
- KAUNDUN, S.S. et al. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism (s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.7, p.3227-3233, 2011.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2ª ed. São Paulo: BASF, 1997.
- LEE, L.J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. **Pest Management Science**, v.56, n.4, p.336-339, 2000.
- MALPASSI, R.N. Herbicide effects on cuticle ultrastructure in *Eleusine indica* and *Portulaca oleracea*. **Biocell**, v.30, n.1, p.51-56, 2006.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 de abril de 2016.
- MOLIN, W.T.; WRIGHT, A.A.; NANDULA, V.K. Glyphosate-resistant goosegrass from mississippi. **Agronomy**, v.3, n.2, p.474-487, 2013.
- MUELLER, T.C. Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennessee. **Weed Science**, v.59, n.4, p.562-566, 2011.
- NG, C.H. et al. Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L) Gaertn from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.55, n.4, p.407-414, 2004.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.
- SHANER, D.L. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. **Pest Management Science**, v.56, n.4, p.320-326, 2000.
- STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v.28, n.6, p.479-484, 1988.
- TAKANO, H.K. et al. Growth, development and seed production of goosegrass. **Planta Daninha**, v.34, n.1, p.249-258, 2016.
- THOMAS, W.E. et al. Glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum*) response and weed management with trifloxysulfuron, glyphosate, prometryn and MSMA. **Weed Technology**, v.20, n.1, p.6-13, 2006.
- ULGUIM, A.R. et al. Manejo de capim pé-de-galinha em lavouras de soja transgênica resistente ao glifosato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.17-24, 2013.
- VARGAS, L. et al. Low level resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to glyphosate in Rio Grande do Sul-Brazil. **Planta Daninha**, v.31, n.3, p.677-686, 2013.

- VIDAL, R.A. et al. Resistência de *Eleusine indica* aos inibidores de ACCase. **Planta Daninha**, v.24, n.1, p.163-171, 2006.
- YUAN, C.I.; HSIEH, Y.C.; CHIANG, M.Y. Glyphosate-resistant goosegrass in Taiwan: cloning of target enzyme (EPSPS) and molecular assay of field populations. **Plant Protection Bulletin**, v.47, n.2, p.251–261, 2005.
- YU, Q. et al. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta**, v.225, n.2, p.499-513, 2007.
- YU, Q. et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**, v.167, n.4, p.1440-1447, 2015.

CAPÍTULO 3

Mecanismo de resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha

Mecanismo de resistência ao glyphosate em capim pé-de-galinha

RESUMO: Populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate foram identificadas em lavouras de grãos do Oeste do Estado do Paraná. O objetivo deste trabalho foi avaliar o mecanismo que confere a resistência e validar um rápido marcador rápido para mapear elevado número de populações. Um experimento de dose resposta foi realizado com as mesmas doses, estágio de aplicação, equipamento de aplicação e análise estatística do Capítulo 2. Também foi quantificado o acúmulo de chiquimato em plantas suscetíveis e resistentes as 24, 48, 96 e 144 horas após a aplicação de glyphosate (540 e 1440 g e.a. ha⁻¹). Fragmentos de 330 pb do gene da EPSPS foram sequenciados. Por fim, um ensaio de TaqMan SNP foi desenvolvido em função do fragmento sequenciado da EPSPS. O fator de resistência foi de 4,8-8,4 e as doses necessárias para controle e redução da massa seca em 80% foram de 1248 (C₈₀) e 1443 (GR₈₀) respectivamente. O acúmulo de chiquimato no biótipo suscetível foi maior que no biótipo resistente em até sete vezes. O sequenciamento revelou uma mutação no gene da EPSPS na posição 106 de uma prolina por uma serina (P106S) em plantas resistentes, o que está associado ao mecanismo de resistência. A sonda TaqMan pode ser utilizada para mapear de forma rápida e eficiente elevado número de populações de capim pé-de-galinha contendo a mutação P106S.

Palavras-chave: P106S, resistência de sítio de ação, mecanismo de resistência, acúmulo de chiquimato.

Mechanism of glyphosate resistance in goosegrass

ABSTRACT: Glyphosate-resistant goosegrass biotypes were recently identified in a grain production field located in the mid-west of Paraná State, southern Brazil. This study aimed to elucidate the molecular basis of this case of resistance and to develop a molecular marker for rapid detection of resistance in a large number of populations. A dose-response experiment was conducted in the greenhouse with the same doses, application timing, application equipment and data analysis of Chapter 2. A shikimate accumulation assay in susceptible and resistant biotypes was also conducted within 24, 48, 96 and 144 hours after glyphosate application (540 and 1440 g ae ha⁻¹). Fragments of the EPSPS gene covering regions where mutations related to target site resistance to glyphosate have been previously documented in the literature were sequenced. A TaqMan SNP assay was designed in order to develop a quick method to survey a large number of plants for glyphosate resistance. The resistance factor (RF) of this biotype was 4.86 - 8.45. The population can be controlled 80% with 1248 (C₈₀) – 1443 (GR₈₀) g ae ha⁻¹ glyphosate whereas the field use rate of glyphosate is 960 g ae ha⁻¹. The shikimate accumulation in the susceptible biotype was higher than in the resistant one in up to 7 fold, confirming the results obtained in the dose-response experiment. The resistant plants harbored a P106S mutation in the target gene EPSPS. The TaqMan probe can be used for surveying glyphosate resistant goosegrass populations with P106S mutation.

Keywords: P106S, mechanism of resistance, shikimate accumulation, target site resistance, TaqMan SNP assay.

INTRODUÇÃO

O capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) é uma planta daninha anual de crescimento rápido e alto potencial de competição interespecífica (Takano et al., 2016). Seu centro de origem provavelmente é a Ásia e foi distribuída pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, com maior presença em regiões entre os trópicos (Mueller et al., 2011). As espécies do gênero *Eleusine* são diplóides ($x=9$), autógamas e produzem elevada quantidade de sementes, que são disseminadas principalmente pelo vento (Ng et al., 2004a).

Historicamente, existem relatos de resistência de capim pé-de-galinha a diversos mecanismos de ação e em diversos países: inibidores de mitose (trifluralin) nos Estados Unidos (Mudge et al., 1984), inibidores de ALS (imazethapyr) na Costa Rica, inibidores de ACCase na Malásia, Brasil e Estados Unidos (Leach et al., 1995; Osuna et al., 2012; McCullough et al., 2016), inibidores do fotossistema I (paraquat) na Malásia, Austrália e Estados Unidos (Buker et al., 2002) e inibidores de EPSPS (glyphosate) na Malásia, Estados Unidos, Argentina e Filipinas (Lee & Ngim, 2000; Mueller et al., 2011). O primeiro relato da ocorrência de capim pé-de-galinha com resistência ao glyphosate no mundo ocorreu em 1997, em pomares da Malásia (Lee e Ngim, 2000). Em termos de resistência múltipla, o primeiro caso foi relatado em 1997, envolvendo os inibidores da EPSPS e da ACCase. O segundo foi registrado em 2009, com os inibidores de FSI e da GS-GOGAT, e neste mesmo ano, populações que apresentam resistência a até quatro mecanismos de ação simultaneamente (EPSPS, ACCase, PSI e GS-GOGAT) também foram relatadas (Seng et al., 2010; Jalaludin et al., 2014; Heap, 2017).

Há evidências de que o mecanismo de resistência de capim pé-de-galinha ao glyphosate envolve mutação no gene da EPSPS ou super expressão da EPSPS (Baerson et al., 2002; Ng et al., 2004b; Kaundun et al., 2011; Yu et al., 2015). Nestes casos, uma mutação simples (P106S ou P106T) confere às plantas níveis intermediários de resistência ($FR < 10$), no entanto, também pode ocorrer dupla mutação no sítio de ação da enzima (T102I e P106S), o que confere à população mutante elevados níveis de resistência ($RF > 10$) (Yu et al., 2015).

Single nucleotide polymorphism (SNP) são variações ou mutações que ocorrem em uma única base nitrogenada dentro de um segmento específico do DNA dentro do genoma de um indivíduo (Shen et al., 2009). SNPs tem sido instrumentos na elucidação de bases genéticas que conferem diversas características em plantas, incluindo a resistência a herbicidas (Délye et al., 2002; Ng et al., 2004a). A técnica de genotipagem utilizando sondas

TaqMan já é bastante difundida na área da saúde humana e também já foi utilizada como um marcador rápido para detectar plantas de *Kochia scoparia* resistentes aos inibidores da ALS (Warwick et al., 2008; Beckie et al., 2011). O princípio da TaqMan baseia-se na atividade exonuclease 5'-3' da Taq polimerase para clivar uma sonda dupla marcada durante a hibridação com a sequência alvo complementar, sendo a detecção baseada em RT-PCR e fluorescência (Holland et al., 1991). No caso do capim pé-de-galinha, em que o mecanismo de resistência normalmente envolve um único SNP (P106), é possível utilizar esta técnica para mapear um grande número de populações de forma simples e eficiente.

Antes da introdução da soja RR® no Brasil, o manejo de capim pé-de-galinha era baseado em aplicações de herbicidas inibidores da ACCase. Atualmente, no caso do sistema de sucessão de soja RR® e milho RR®, alguns produtores chegam a realizar até cinco aplicações de glyphosate por ano. Neste sentido, o uso contínuo de glyphosate ao longo de 10 anos de cultivo de soja RR® no Brasil, levou a seleção de oito espécies resistentes a este herbicida, sendo o caso mais recentemente identificado o do capim pé-de-galinha (Capítulo 2). Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi elucidar o mecanismo de resistência de capim pé-de-galinha ao glyphosate, bem como validar o marcador TaqMan SNP para rápida detecção de populações resistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Dose resposta de glyphosate

A população de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate utilizada foi a mesma do Capítulo 2, proveniente do município de Campo Mourão – Paraná (24°09'29''S; 52°29'04''W). A população suscetível foi coletada em área de pousio, sem histórico de aplicação de glyphosate, localizada no município de Mandaguaçu – Paraná (23°14'31''S; 52°00'21''W). Estas populações foram submetidas a experimento de dose resposta de glyphosate em casa-de-vegetação. As doses utilizadas, condições de aplicação, estágio da planta daninha e análise estatística foram os mesmos adotados no Capítulo 2.

Acúmulo de chiquimato

O experimento de acúmulo de chiquimato foi conduzido no Laboratório de Bioquímica de Plantas – UEM. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 2x2x4, em que o primeiro fator era constituído de duas doses de glyphosate (540 e 1440 g e.a. ha⁻¹), o segundo fator de duas populações de capim pé-de-galinha (resistente e suscetível), e o terceiro fator de diferentes tempos de coleta após a aplicação (24, 48, 96 e 144 horas). Para cada combinação, adotou-se quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado.

A metodologia para extração do chiquimato foi baseada em protocolo utilizando microondas (Matallo et al., 2009). Plantas foram secas em estufa de ar forçado a 65 °C durante 48 horas e trituradas em moinho-bola por 40 segundos. Amostras de 0,4 g de cada planta foram solubilizadas em 10 mL de água acidificada em ácido fosfórico (pH=2), homogeneizando-se a solução durante 30 minutos em agitador horizontal a 32 rpm. Por fim, as amostras foram levadas ao microondas (Panasonic Modelo NN-S62 B) durante 10 segundos e resfriadas a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após a extração, as amostras foram diluídas em ácido fosfórico (3,5 mM) em 1:50 e em seguida filtradas em filtro de membrana de 0,22 µm (Millex-GV, Millipore). A leitura do chiquimato foi determinada utilizando HPLC (LC-20A Prominence, Shimadzu) de injeção manual. O tempo total de corrida foi de 15 a 20 minutos, com retenção de chiquimato aos 8,1 min. Para a determinação dos níveis de chiquimato, uma curva de calibração de concentração deste composto foi utilizada, em que a correlação entre a área obtida pelo HPLC e a concentração de chiquimato apresentou correlação positiva de 0,99 (Figura 7).

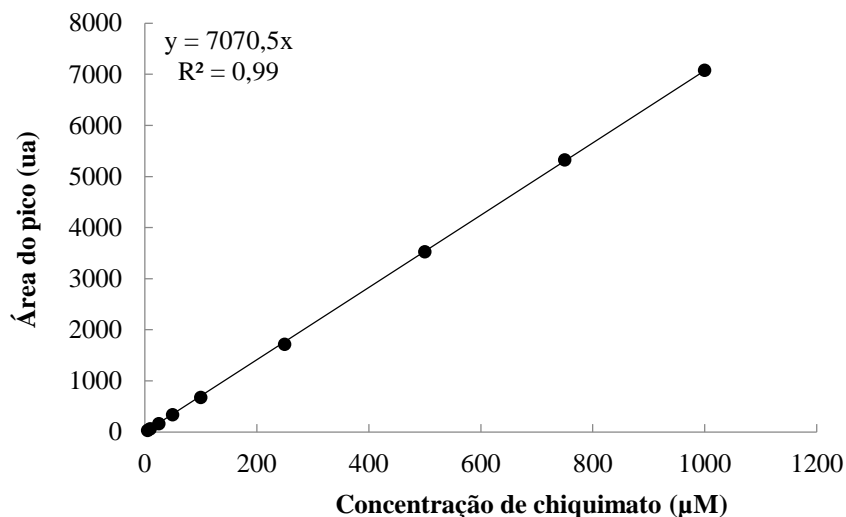


Figura 7. Curva de calibração da concentração de chiquimato em função da área do pico na leitura do HPLC.

Os valores obtidos foram apresentados por meio de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$) (Payton et al., 2000). O critério decisório foi baseado nos limites superiores e inferiores das médias. Uma vez que estes não se sobrepõem, assume-se que as médias daqueles tratamentos são significativamente diferentes.

Sequenciamento do gene da EPSPS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Matogrossense do Algodão (IMAmt) localizado em Primavera do Leste. Inicialmente, DNA genômico foi extraído de dez plantas de capim pé-de-galinha suscetíveis e dez resistentes ao glyphosate. Para isso, aproximadamente 0,2 g de tecido foliar foi utilizado para extração do DNA, procedendo-se de acordo com protocolo descrito no Anexo 1.

Posteriormente, fragmentos de 330 pares de base (pb) contendo região da mutação já reportada em outros trabalhos (P106, correspondente a sequência EPSPS em *Arabidopsis thaliana* reportada por Klee et al., 1987) foram amplificados via *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Diversos *primers* são descritos na literatura, em trabalhos sobre mutação no gene da EPSPS relacionados ao mecanismo de resistência (Ng et al., 2003; Baerson et al., 2002; Kaundun et al., 2008; Yu et al., 2015; Chen et al., 2015).

Sete pares de *primers* foram testados de acordo com a temperatura de anelamento e configurações de ciclagem de cada um (Tabela 7). As reações de PCR foram feitas por meio do QIAGEN Multiplex PCR Kit®, utilizando-se 7,5 µL de Master Mix®, 1,5 µL de Q-

Solution[®]; 1,5 µL de *primer* em concentração final de 0,2 µM de cada *primer* (F-Forward e R-Reverse), 2,5 µL de água e 2 µL de DNA, o que proporcionou um volume final de 15 µL. As configurações de ciclagem da PCR foram estabelecidas de acordo com as especificações do fabricante QIAGEN: 1 ciclo de 95°C por 15 min, 36 ciclos de 94°C por 30 seg, T°C de anelamento de cada *primer* (T_m) por 90 seg, e 72°C por 60 seg, e uma extensão final de 72°C por 10 min. Após a PCR, as amostras foram analisadas por meio de eletroforese capilar (QIAxcel, QIAGEN[®]), com tempo médio de corrida de 10 minutos.

Tabela 7. Pares de *primers* testados nas diferentes populações de capim pé-de-galinha.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	T _m (°C)*
1 - Ng et al. (2003)	F: AGGAGATCTCCGGCGTCGTG R: GCAGCAGTTACGGCTGCTGTC	61
2 - Ng et al. (2003)	F: AGCGTAACTGTTACCGGTCCAC R: ACGAAAGTGCTCAGCACGTCG	59
3 - Ng et al. (2003)	F: GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTG R: GTCATTTCAACATAAGGGATGGAG	54
4 - Ng et al. (2003)	F: GAAGGTGATGCCTCAAGTGCG R: GTCCAGTCCTTCCTCGACCG	58
5 - Baerson et al. (2002)	F: GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTG R: TCAATCCGACAACCAAGTCGC	57
6 - Kaundun et al. (2008)	F: CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA R: TAACCTTGCCACCAGGTAGCCCTC	60
7 - Chen et al. (2015)	F: GGTGGATAACCTTTTAAACAGTGAG R: TTAGTTCTTGACGAAAGTGCTGAGC	58

*T_m: temperatura de anelamento de cada *primer*.

Genotipagem prévia utilizando *High Resolution Melting* (HRM)

Além dos testes de PCR convencional, as amostras foram analisadas pela técnica de dissociação em alta resolução ("*high resolution melting*", HRM). Para isso, os *primers* foram diluídos para uma concentração de 10 µM e em cada amostra foi adicionado 0,6 µL de *primer* (F e R), Master Mix 2x (5 µL) para amplificação em HRM, 3,4 µL de água ultra pura e 1,0 µL de amostra de DNA para um volume final de 10 µL. As amostras foram colocadas no HRM (Viia 7 RT-PCR System, ThermoFisher[®]) e submetidas a ciclagem de: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e T_m°C por 1 min, e para a curva de metilação, adotou-se uma ciclagem de 95°C por 10 segundos e 60°C por um minuto.

Após o teste dos *primers*, optou-se pela utilização do *primer* 6 (Kaundun et al., 2008) para sequenciar as amostras, levando em consideração os resultados obtidos pela amplificação e também a sua região de anelamento no gene da EPSPS (Figura 8). As amostras foram submetidas à uma nova reação de PCR, utilizando-se as mesmas configurações de ciclagem anteriormente descritas, no entanto, com volume final de 45 µL.

```
GCGGGCGCGGAGGAGGTGGTGCAGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCGTCGTGAAGCTGCCGGG
GTCCAAGTCGCTCTCCAACCGGATCCTCCTGCTCTCCGCCCTCGCCGAGGGAACAACACTGTGGTGG
TAACCTTTTAAACAGTGAGGACGTCCACTACATGCTCGGGGCCCTGAAAACCCTCGGACTCTCTGT
GGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCAGTTGAGA
AGGATGCGAAAGAGGAGGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGA>ACTGCAATGCGACCATTGAC
AGCAGCCGTAACCTGCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGG
AGAGACCCATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTTGGTGCGGATGTTGATTGTTTCCTTGG
CACTGACTGCCACCTGTTTCGTGTCAAGGGAATCG<GAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAGTTAT
CTGGTTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGT
GGAGATTGAAATCATTGATAAACTGATCTCCATCCCTTATGTTGAAATGACATTGAGATTGATGGA
GCGTTTTGGCGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATCAAGGGAGGTCAAA
AATACAAGTCCCCTAAAAATGCCTACGTGGAAGGTGATGCCTCAAGTGCAGCTATTTCTTGGCTG
GTGCTGCAATCACTGGAGGGACTGTGACTGTTGAAGGTTGTGGCACCACCAGTCTGCAGGGTGATG
TGAAATTTGCCGAGGACTCGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGGACTGAAACTAGCGTAACT
GTTACCGGTCCACAACGTGAGCCATTTGGGAGGAAACACCTAAAAGCTATTGATGTTAACATGAAC
AAAATGCCCGATGTCGCCATGACTCTTGCCGTGGTTGCCCTATTTGCTGATGGCCCAACTGCTATCA
GAGATGTGGCTTCTGGAGAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGGTTGCAATCCGGACTGAGCTAACA
AAGCTGGGAGCGTCGGTCGAGGAAGGACTGGACTACTGCATTATCACACCGCCCGAGAAGCTGAA
CGTAACGGCCATCGACACCTACGATGACCACAGGATGGCCATGGCCTTCTCCCTCGCCGCCTGCGC
CGACGTGCCTGTGACCATCCGGGACCCCGGCTGCACCCGCAAGACCTTCCCAGACTACTTCGACGT
GCTGAGCACTTTCGTCAAGAACTAA
```

Figura 8. Sequência do gene da enzima EPSPS em capim pé-de-galinha, região de anelamento do *primer* 6 (R e F - sublinhados) e locais onde as mutações nas posições T102 e P106 são documentadas (negrito). (GenBank: KM078728.1).

Antes de serem enviadas ao sequenciamento, as amostras foram submetidas a purificação do produto da PCR utilizando-se o Kit de purificação de PCR QIAquick®. Uma vez purificadas, realizou-se uma nova amplificação das amostras para atestar a integridade do DNA que foi confirmada utilizando eletroforese capilar (QIAxel, QIAgen®). Por fim, as amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Ludwig Biotecnologia, e as sequências obtidas foram comparadas com as suas homólogas anteriormente reportadas (Genbank AY157642 e AY157643).

Validação da Sonda TaqMan SNP como um marcador de rápida identificação de populações resistentes

A mesma metodologia proposta por Warwick et al. (2008) com algumas modificações foi empregada para a genotipagem de 240 indivíduos resistentes e 60 indivíduos suscetíveis de capim pé-de-galinha. Inicialmente, sementes de populações sabidamente resistentes e suscetíveis foram semeadas em vasos com capacidade de 0,3 L. No momento em que as plantas atingiram o estágio de um perfilho, estas foram submetidas a aplicação de 960 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate. Aos 28 dias após a aplicação (DAA), o controle obtido pelo herbicida foi avaliado de forma binária (ausência de controle ou morte da planta).

Além disso, um protocolo de ensaio TaqMan SNP[®] foi desenhado com base nos resultados de sequenciamento do gene da EPSPS em plantas resistentes, os quais demonstraram um ponto de mutação (C para T), resultando na substituição de uma prolina para uma serina na posição 106 (P106S). As sondas e *primers* foram desenvolvidos pela empresa Applied Biosystems[®] baseando-se na sequência da EPSPS que foi disponibilizada (Tabela 8). Dois *primers* foram desenhados para amplificar fragmento de 58 pb contendo o SNP na posição 106, e duas *Minor Groove Binding* (MGB) para discriminar os alelos C e T (sonda VIC[®] para o alelo T e a sonda FAM[®] para o alelo C).

Tabela 8. *Primers* e sondas TaqMan[®] utilizadas para a genotipagem do SNP na posição 106 do gene da EPSPS em capim pé-de-galinha.

<i>Primer*</i>	Sequência (5'-3')	Região de homologia
<i>Forward</i>	GGGAATGCTGGAAGTCA	1051-1069
<i>Reverse</i>	TTCTCCAGCAGCAGTTACG	1109-1090
Sonda MGB para o alelo C	VIC-TGCTGTCAATGGTCGCAT	1070-1089
Sonda MGB para o alelo T	FAM-TGCTGTCAATGATCGCAT	1070-1089

*MGB: *Minor Groove Binding*

Cada reação de PCR de genotipagem (10 µL) era composta de 20 ng de DNA genômico, 0,5 µL de TaqMan SNP[®] personalizada contendo os *primers* e as sondas MGB, além de 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix[®]. As condições de PCR foram: 15 min a 95 °C; seguida de 36 ciclos de 30 s a 94°C e 1 min a 72°C em termociclador Viiia 7 RT-PCR System[®]. Todas as reações de PCR foram repetidas duas vezes e os resultados foram comparados com a resposta de cada planta ao glyphosate em casa-de-vegetação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do experimento de dose resposta confirmaram a resistência e suscetibilidade dos biótipos. As doses necessárias para 80% de controle (C_{80}) ou redução da massa seca (GR_{80}) foram de 1443,0 e 1248,2 respectivamente, enquanto que o fator de resistência variou entre 4,8 e 8,4 (Tabela 9 e Figura 9).

Tabela 9. Parâmetros estimados do modelo de Streibig (1988) e fatores de resistência (FR) para % de controle ou redução da massa seca das populações suscetíveis (S) e resistentes (R), bem como as doses necessárias para proporcionar 50 ou 80% de controle ou redução de massa seca de capim pé-de-galinha.

	C_{50} or GR_{50}	C_{80} or GR_{80}	a	b	C	FR
Controle R	779,94	1443,01	103,10	802,43	-2,11	4,8
Controle S	160,62	263,00	100,87	161,63	-2,75	
Massa seca da parte aérea R	640,67	1248,20	3,30	726,13	2,93	8,4
Massa seca da parte aérea S	100,10	223,70	3,86	85,08	1,42	

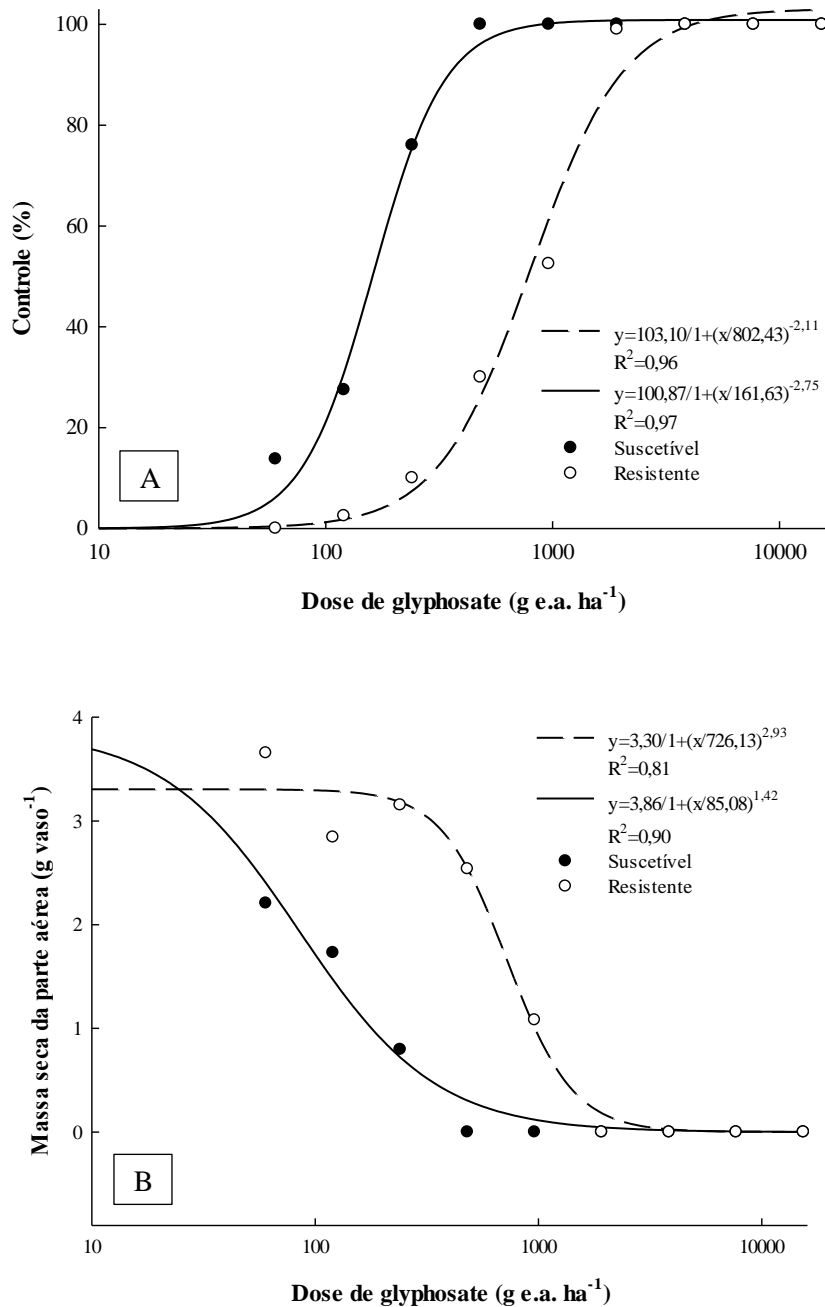


Figura 9. Porcentagem de controle (A) e massa seca da parte aérea (B) em função de doses crescentes de glyphosate aos 28 dias após a aplicação em populações suscetíveis e resistentes.

Os resultados de acúmulo de chiquimato também apontaram diferenças significativas entre plantas de capim pé-de-galinha resistentes e suscetíveis ao glyphosate (Figura 10). Para a dose de 540 g e.a. ha⁻¹, diferenças entre essas populações são visualizadas a partir de 96 horas após a aplicação, enquanto que para a dose de 1440 g e.a. ha⁻¹ essa diferença é significativa a partir de 48 horas. Considerando o tempo de 96 h, a diferença entre o acúmulo

de chiquimato de plantas suscetíveis e resistentes é de até sete vezes. Estes resultados são semelhantes aqueles obtidos com capim pé-de-galinha dos Estados Unidos, os quais apresentaram diferenças de quatro vezes mais acúmulo de chiquimato em plantas resistentes que em plantas suscetíveis (Mueller et al., 2011).

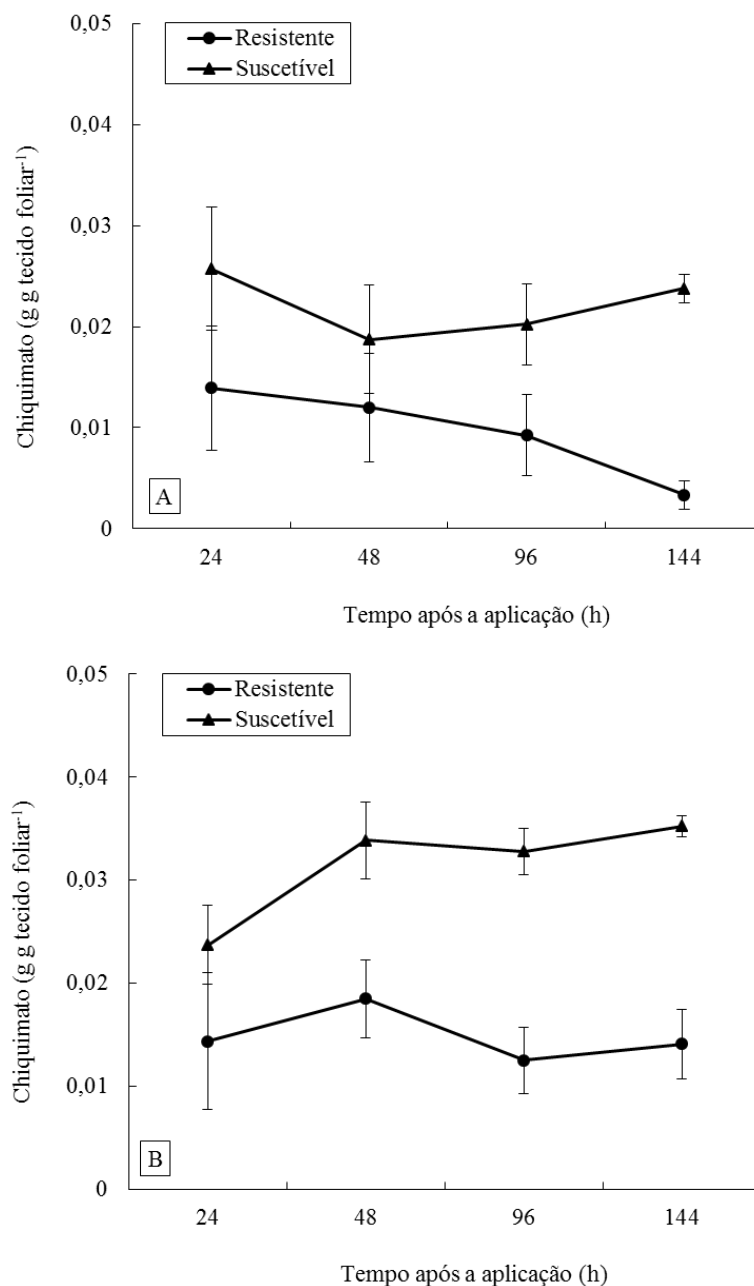


Figura 10. Acúmulo de ácido chiquímico após a aplicação de duas doses de glyphosate (A - 540; B - 1440 g e.a. ha⁻¹) em plantas de capim pé-de-galinha resistentes e suscetíveis.

O glyphosate compete com o substrato fosfoenolpiruvato – PEP, inibindo a enzima EPSPS e evitando a transformação de chiquimato em corismato. Esta inibição impede a

formação de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), o que leva a planta a morte (Duke & Powles, 2008). Uma vez que o chiquimato é acumulado após a aplicação de glyphosate na planta, significa que a rota do ácido chiquimico foi inibida, sendo o biótipo suscetível ao herbicida (Sammons & Gaines, 2014). No entanto, o menor acúmulo de chiquimato em plantas resistentes ao glyphosate é um forte indício de que o mecanismo de resistência está relacionado à insensibilidade da EPSPS destas plantas ao glyphosate (Baerson et al., 2002). Respostas similares após a aplicação de chiquimato também foram observadas para outras espécies como *Ambrosia artemisiifolia*, *Trifolium repens* e *Conyza canadensis* (Mueller et al., 2008).

Todos os *primers* testados apresentaram amplificação nas amostras de DNA de capim pé-de-galinha. Apesar disso, optou-se pela utilização do *primer* 6 (Kaundun et al., 2008) para o estudo de sequenciamento, uma vez que a região de amplificação deste *primer* engloba as posições 102 e 106 do gene da EPSPS, as quais estão relacionadas a casos documentados de resistência ao glyphosate nesta espécie. Além disso, o fragmento amplificado por este *primer* apresentou maior nitidez e reprodutibilidade o que resulta em maior confiabilidade nos dados obtidos (Figura 11).

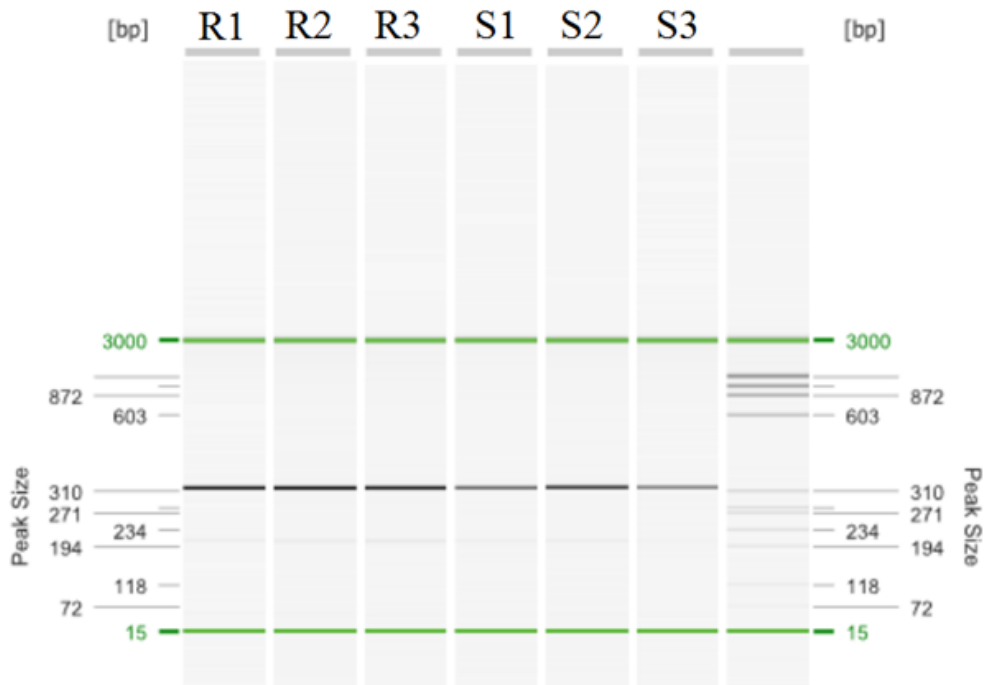


Figura 11. Fragmento de 330 pb gerado pela amplificação do *primer* 6 em triplicata de plantas suscetíveis (S1, S2 e S3) e resistentes (R1, R2 e R3) ao glyphosate.

A análise do *High Resolution Melting* (HRM) nas amostras de capim pé-de-galinha utilizando o *primer 6*, proporcionou resultados consistentes e capazes de distinguir os indivíduos resistentes dos indivíduos suscetíveis (Figura 12). Para confirmar se as amostras mantinham esse padrão de curvas, uma segunda repetição da análise HRM foi feita em triplicata de amostras resistentes e suscetíveis, sendo possível verificar o mesmo padrão de curvas e a distinção entre amostras suscetíveis e resistentes nesta segunda análise (Figura 13).

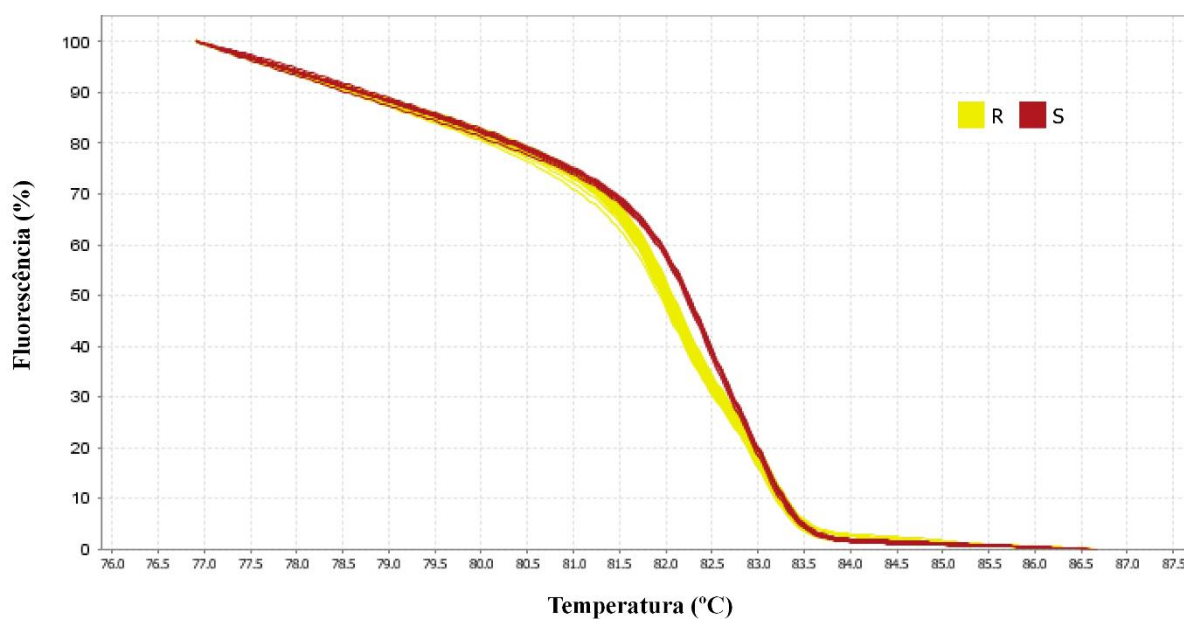


Figura 12. Primeira repetição da análise HRM pela curva de *melting* gerada pelo *primer 6* em 14 amostras de plantas resistentes e três amostras de plantas suscetíveis ao glyphosate. R - resistente; S - suscetível.

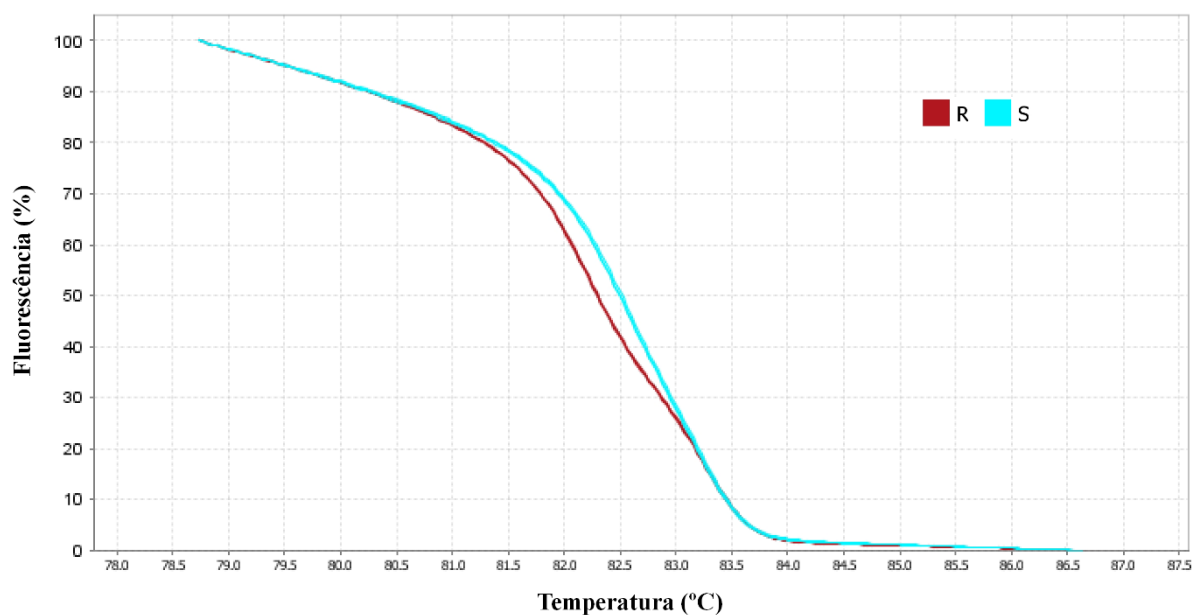


Figura 13. Segunda repetição da análise HRM pela curva de *melting* gerada pelo *primer 6* em três amostras de plantas resistentes e três amostras de plantas suscetíveis ao glyphosate. R - resistente; S - suscetível

A genotipagem dos indivíduos pela técnica de HRM é capaz de distinguir os indivíduos quanto ao seu genótipo de forma muito precisa. Esta técnica discrimina as sequências principalmente em função da concentração das bases citosina (C) e guanina (G) do fragmento, uma vez que a temperatura de dissociação destas duas bases nitrogenadas é maior do que para adenina (A) e timina (T). Um único ponto de mutação pode ser detectado pela técnica HRM, no entanto, não é possível detectar o local exato desta alteração (Wittwer et al., 2003).

As amplificações das amostras foram realizadas via PCR e o tamanho dos fragmentos foi de aproximadamente 330 pb (Figura 11), o que está de acordo com o trabalho realizado por Kaundun et al. (2008). Esses autores utilizaram o *primer 6* para amplificar fragmento de 330 pb do gene da EPSPS e verificaram que uma mutação simples na posição 106 (P106S) era responsável por conferir resistência ao glyphosate em plantas de capim pé-de-galinha.

O sequenciamento do fragmento de 330 pb do gene da EPSPS revelou que a população resistente apresentava uma mutação pontual em um nucleotídeo (C para T), o que resulta na mudança da codificação de uma prolina para uma serina P106S, o que não foi verificado para as suscetíveis (Figura 14). Isso significa que o mecanismo de resistência dessa população do Brasil, envolve alteração no sítio de ação do herbicida, assim como descrito em

outros países (Baerson et al., 2002; Ng et al., 2004a; Kaundun et al., 2008). Apesar de não ter sido verificada no presente trabalho, dupla mutação no sítio de ação do herbicida (T102I e P106S) também pode ocorrer, o que confere à população mutante fatores de resistência mais elevados (FR>10) (Yu et al., 2015).

		096	098	100	102	104	106	108	110	112	114	116
<i>A. thaliana</i>		CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA	ACTGCAATGCGA	CCATTGACAGCAGCCGTA	ACTGCTGCTGGAGGAA							
AY157642 MS		CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA	ACTGCAATGCGA	CCATTGACAGCAGCCGTA	ACTGCTGCTGGAGGAA							
AY157643 MR		CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA	ACTGCAATGCGA	TCAATTGACAGCAGCCGTA	ACTGCTGCTGGAGGAA							
<i>E. indica</i> BS		CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA	ACTGCAATGCGA	CCATTGACAGCAGCCGTA	ACTGCTGCTGGAGGAA							
<i>E. indica</i> BR		CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA	ACTGCAATGCGA	TCAATTGACAGCAGCCGTA	ACTGCTGCTGGAGGAA							
		097	099	101	103	105	107	109	111	113	115	

Figura 14. Alinhamento do fragmento da EPSPS de *Arabidopsis thaliana* [GenBank: CAA29828.1]; populações suscetível (S) e resistente (R) de capim pé-de-galinha da Malásia (AY157642 MS e AY157643 MR) e do Brasil (BS e BR). As bases em cinza representam a substituição do códon CCA para TCA na posição 106 em populações resistentes, o que resulta na mutação P106S responsável pelo mecanismo de resistência.

Mesmo sendo em menor intensidade, plantas resistentes também acumularam chiquimato após a aplicação de glyphosate. Isso se deve ao fato de que a mutação pontual P106S no gene EPSPS tem capacidade apenas de diminuir a afinidade (menor K_i) do glyphosate com o sítio de ligação (Comai et al., 1985; Kaundun et al., 2008), o que permite a atividade do glyphosate em menor intensidade. Mesmo que outros mecanismos de resistência não tenham sido avaliados neste trabalho, diversos trabalhos mostram que o mecanismo resistência de capim pé-de-galinha ao glyphosate não está relacionado à inativação metabólica do herbicida e nem à menor absorção e translocação em plantas resistentes (Tran et al., 1999; Kaundun et al., 2008).

Todas as 300 plantas apresentaram amplificação dos *primers* utilizados na genotipagem utilizando TaqMan SNP. Os dois genótipos, homozigoto-CC e homozigoto-TT, foram claramente separados no gráfico de dispersão (Figura 15). Além disso, as plantas que apresentaram o genótipo TT sobreviveram a aplicação de glyphosate em casa-de-vegetação, enquanto que as plantas com genótipo CC foram suscetíveis ao herbicida. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho, provam que a sonda TaqMan pode ser utilizada como um

marcador de rápida detecção de P106S em um amplo número de populações de capim pé-de-galinha.

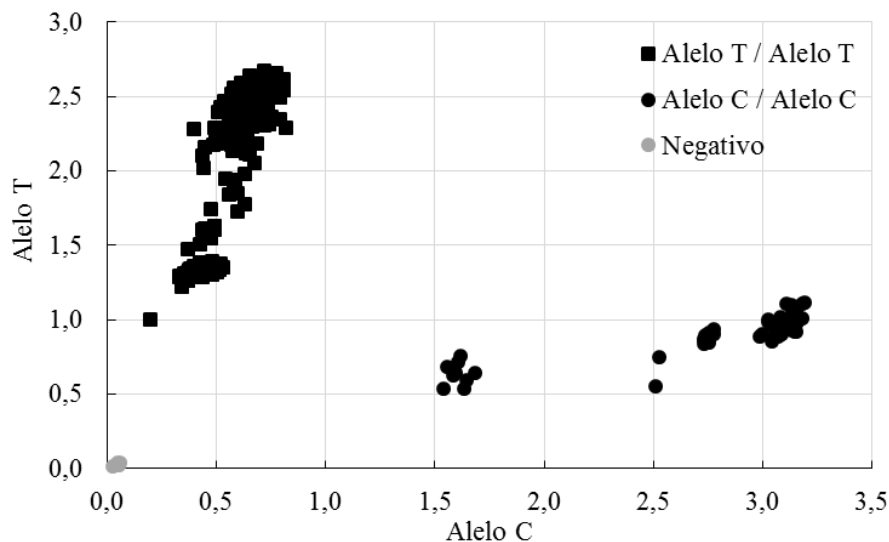


Figura 15. Discriminação alélica de 300 plantas de capim pé-de-galinha. O alelo T representa os indivíduos com a mutação P106S, enquanto que o alelo C representa os indivíduos suscetíveis ao glyphosate.

Os resultados obtidos neste trabalho provam que as populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate apresentaram mutação no gene da EPSPS (P106S), o que está associado ao mecanismo de resistência ao herbicida. Outro possível mecanismo que possa estar presente em populações resistentes é o aumento da expressão ou do número de cópias do gene da EPSPS (Chen et al., 2015). Portanto, futuras pesquisas sobre o mecanismo de resistência em capim pé-de-galinha devem considerar esta observação.

Outro ponto importante é que mesmo o capim pé-de-galinha sendo uma espécie autógama (Ng et al., 2004b), o que torna a velocidade de dispersão de genes de resistência para outras regiões menor do que em plantas alógamas, estratégias de manejo visando ao controle alternativo ao glyphosate serão importantes para controlar e prevenir a dispersão deste caso de resistência.

CONCLUSÃO

A resistência ao glyphosate foi confirmada em casa-de-vegetação (RF=5-8; GR₈₀ and C₈₀=1248-1443 g ha⁻¹). A diferença no acúmulo de chiquimato foi de até sete vezes menor em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis. As plantas consideradas como resistentes ao glyphosate apresentaram um ponto de mutação no gene da EPSPS (P106S), o que está associado ao mecanismo de resistência. A sonda TaqMan SNP pode ser utilizada como uma rápida ferramenta para mapeamento em larga escala de populações contendo a mutação P106S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAERSON, S.R. et al. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v.129, n.3, p.1265-1275, 2002.
- BECKIE, H.J. et al. Occurrence and Molecular Characterization of Acetolactate Synthase (ALS) Inhibitor-Resistant Kochia (*Kochia scoparia*) in Western Canada. **Weed Technology**, v.25, n.1, p.170-175, 2011.
- BUKER, R.S. et al. Confirmation and control of a paraquat-tolerant goosegrass (*Eleusine indica*) biotype. **Weed Technology**, v.16, n.2, p.309-313, 2002.
- CHEN, J. et al. Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) **Planta**, v.242, n.4, p.859-868, 2015.
- COMAI, L. et al. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. **Nature**, v.317, n.1, p.741-745, 1985.
- DÉLYE, C. et al. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *Theoretical and Applied Genetics*. v.104, n.6, p.1114-1120, 2002.
- DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.319-325, 2008.
- HEAP, I. International survey of herbicide-resistant weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Consultado em: 27 de Janeiro de 2017.
- HOLLAND, P.M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n.16, p.7276-7280, 1991.
- JALALUDIN, A. Multiple resistance across glufosinate, glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in an *Eleusine indica* population. **Weed Research**, v.55, n.3, p.82-89, 2014.
- KAUNDUN, S.S. et al. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. **Weed Science**, v.56, n.5, p.637-646, 2008.
- KAUNDUN, S.S. et al. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism (s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.7, p.3227-3233, 2011.
- KLEE, H.J. et al. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. **Molecular and General Genetics**, v.210, n.3, p.437-442, 1987.
- LEE, L.J.; NGIM, J.A. First report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. **Pest Management Science**, v.56, n.4, p.336-339, 2000.

- MATALLO, M.B. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, v.27, n.spe, p.987-994, 2009.
- MCCULLOUGH, P.E. et al. First Report of ACCase-Resistant Goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. **Weed Science**, v.64, n.3, p.399-408, 2016.
- MUDGE, L.C. et al. Resistance of Goosegrass (*Eleusine indica*) to Dinitroaniline Herbicides. **Weed Science**, v.32, n.5, p.591-594, 1984.
- LEACH, G.E. et al. Target enzyme-based resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in *Eleusine indica*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v.51, n.2, p.129–136, 1995.
- MUELLER, T.C. et al. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. **Weed Research**, v.48, n.2, p.455–460, 2008.
- MUELLER, T.C. et al. Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennessee. **Weed Science**, v.59, n.4, p.562-566, 2011.
- NG, C.H. et al. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, v.43, n.2, p.108-115, 2003.
- NG, C.H. et al. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed Science**, v.52, n.4, p.564-570, 2004a.
- NG, C.H. et al. Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L) Gaertn from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.55, n.4, p.407-414, 2004b.
- OSUNA, M.D. et al. Resistance to ACCase inhibitors in *Eleusine indica* from Brazil involves a target site mutation. **Planta Daninha**, v.30, n.3, p.678–681, 2012.
- PAYTON, M.E. et al. Testing statistical hypotheses using standard error bars and confidence intervals. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.31, n.5, p.547-552, 2000.
- SENG, C.T. et al. Initial report of glufosinate and paraquat multiple resistance that evolved in a biotype of goosegrass (*Eleusine indica*) in Malaysia. **Weed Biology and Management**, v.10, n.4, p.229–233, 2010.
- STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v.28, n.6, p.479-484, 1988.
- SAMMONS, R.D.; GAINES, T.A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v.70, n.9, p.1367–1377, 2014.
- SHEN, G. et al. The TaqMan Method for SNP Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. **Methods in Molecular Biology**, v.578, n.1, p.293-306, 2009.
- TAKANO, H.K. et al. Growth, development and seed production of goosegrass. **Planta Daninha**, v.34, n.4, p.249-258, 2016.
- TRAN, M. et al. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. In: Asian-Pacific Weed Science Society Society Conference, 17., 1999, Bangkok. **Resumos...** Bangkok: Asian-Pacific Weed Science Society, 1999.

- WARWICK, S.I. et al. Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, v.56, n.6, p.797-806, 2008.
- WITTEWER, C.T. et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v.49, n.6, p.853–860, 2003.
- YU, Q. et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**, v.167, n.4, p.1440-1447, 2015.

CAPÍTULO 4

Controle químico de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate

Controle químico de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate

Resumo: A utilização de misturas e rotação de herbicidas de diferentes mecanismos de ação são fundamentais para o manejo da resistência a herbicidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes herbicidas em pré e pós-emergência recomendados para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate nas culturas da soja e do milho. Para isso, foram conduzidos quatro experimentos em casa-de-vegetação, sendo um com aplicações em pré- e outros três em pós-emergência. Em pré-emergência foram avaliados o número de plantas emergidas e a porcentagem de controle aos 20, 35 e 50 dias após a aplicação (DAA). Em pós-emergência foi avaliada a porcentagem de controle aos 14 e 28 DAA sobre plantas com um perfilho (E1) e quatro perfilhos (E2). O uso de herbicidas residuais para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate constitui uma ferramenta de extrema importância para o seu manejo efetivo. O estágio de aplicação é determinante para se obter eficácia em pós-emergência. Paraquat e [paraquat+diuron] são eficazes no controle desta espécie. Os herbicidas inibidores da ACCase isolados foram mais eficazes que as suas associações com glyphosate, especialmente em plantas com quatro perfilhos. As associações de inibidores da síntese de carotenoides apresentaram elevado sinergismo com atrazine e não com glyphosate.

Palavras-chave: *Eleusine indica*, herbicidas alternativos, soja, milho, estágio de aplicação.

Chemical control of goosegrass resistant to glyphosate

Abstract: Mixture and rotation of herbicides with different modes of action are fundamental for the management of herbicide resistance. The objective of this research was to evaluate different pre- and post-emergence herbicides to control goosegrass in soybean and corn crop. Four greenhouse experiments were conducted, one in pre-emergence and the others in post-emergence. In pre-emergence the number of emerged plants and the control percentage at 20, 35 and 50 days after application (DAA) were evaluated. In post-emergence, the control percentage was evaluated at 14 and 28 DAA on plants with one tiller (E1) and four tillers (E2). The use of residual herbicides for the control of glyphosate-resistant goosegrass constitutes a very important tool for its effective management. The application timing is also crucial for post-emergence efficacy. Paraquat and [paraquat + diuron] are effective in controlling this species. The application of ACCase inhibitors herbicides alone was more effective than their associations with glyphosate, especially in plants with four tillers. The associations of HPPD inhibitors showed high synergism with atrazine and not with glyphosate.

Keywords: *Eleusine indica*, alternative herbicides, soybean, corn, application timing.

INTRODUÇÃO

O capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) é considerado como uma das mais importantes plantas daninhas do mundo. Suas características intrínsecas como ciclo fotossintético do tipo C4, rápido crescimento e elevada produção de sementes que podem germinar em diferentes condições de solo (alta salinidade, alto ou baixo pH, compactação e temperatura), fazem com que esta espécie seja extremamente competitiva no ambiente (Ismail et al., 2002; Chauhan & Johnson, 2008; Takano et al., 2016a). A ocorrência de capim pé-de-galinha ocorre principalmente em beiras de estradas e rastros de maquinários devido à compactação do solo nestes locais e à ausência de outras plantas ao seu redor (Arrieta et al., 2009).

Além destes fatores, o capim pé-de-galinha apresenta histórico de resistência a diversos mecanismos de ação de herbicidas como inibidores da síntese de microtúbulos (Mudge et al., 1984), inibidores do fotossistema I (Buker et al., 2002), inibidores do fotossistema II (Brosnan et al., 2008), inibidores da ACCase (McCollough et al., 2016), inibidores da EPSPS (Lee & Ngim, 2000), inibidores da GS (Jalaludin et al., 2010). No Brasil, a intensa utilização de inibidores da ACCase para o controle de gramíneas durante 20 anos de cultivo de soja convencional (não RR[®]) levou à seleção de capim pé-de-galinha resistente a inibidores da ACCase (Vidal et al., 2006). Dez anos depois da introdução da soja RR[®], a pressão de seleção imposta pelas aplicações de glyphosate selecionou populações de capim pé-de-galinha resistentes a este herbicida (Takano et al., 2017).

A resistência de plantas daninhas ao glyphosate constitui o principal problema de resistência a herbicidas no mundo (Powles, 2008). A seleção de espécies resistentes a este herbicida tem ocorrido em resposta às atuais práticas de manejo empregadas no campo como a utilização repetida de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação (Beckie & Reboud, 2009). Portanto, o manejo efetivo da resistência a herbicidas deve considerar todas as opções disponíveis de controle cultural, mecânico e químico, visando minimizar a pressão de seleção causada por uma única ferramenta (Norsworthy et al., 2012). A utilização de doses recomendadas de herbicidas, a associação de princípios ativos, bem como a rotação de diferentes mecanismos de ação são fundamentais para o manejo de plantas daninhas resistentes (Shaner, 2000; Johnson & Gibson, 2006; Norsworthy et al., 2012).

Considerando que o capim pé-de-galinha é uma importante planta daninha no sistema de sucessão soja e milho no Brasil, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes

herbicidas recomendados para o uso nestas culturas visando ao controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação no Centro de Treinamento em Irrigação (CTI), que pertence ao Campus sede da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizada em Maringá, PR. O período de condução dos ensaios foi de 07/09/2016 a 26/11/2016.

No total, quatro experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para todos os experimentos, foram utilizadas sementes de capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) sabidamente resistentes ao glyphosate oriundas de lavoura de soja, localizada na região de Campo Mourão – PR. As unidades experimentais foram compostas por vasos de 3 dm³ de capacidade, os quais foram preenchidos com solo que apresentava valores de pH em água de 6,30; 2,94 cmolc de H⁺ + Al³⁺ dm⁻³ de solo; 5,30 cmolc dm⁻³ de Ca⁺²; 1,56 cmolc dm⁻³ de Mg⁺²; 0,37 cmolc dm⁻³ de K⁺; 4,40 mg dm⁻³ de P; 7,90 g dm⁻³ de C; 710 g kg⁻¹ de areia; 20 g kg⁻¹ de silte e 270 g kg⁻¹ de argila.

Pré-emergência (Experimento 1)

Foram avaliados 16 tratamentos herbicidas aplicados em pré-emergência e uma testemunha sem aplicação (Tabela 10). Inicialmente, 100 sementes de capim pé-de-galinha foram semeadas em cada vaso em profundidade de aproximadamente 0,5 cm. Em seguida, foi aplicada lâmina de irrigação equivalente à 20 mm de precipitação. Posteriormente, a aplicação dos tratamentos foi realizada utilizando pulverizador costal de pressão constante à base de CO₂, equipado com barra munida de três pontas tipo jato leque XR 110.02, espaçadas de 50 cm entre si, sob pressão de 2,0 kgf cm⁻². Estas condições de aplicação proporcionaram vazão de 200 L ha⁻¹. No momento da aplicação, as condições climáticas encontradas foram: Temp. = 25°C; UR = 75%; velocidade do vento = 1,5 km h⁻¹.

Tabela 10. Nomes comum, produto comercial e respectivas doses utilizadas no Experimento 1.

Nome comum	Produto Comercial	Dose* (g i.a. ha ⁻¹)	Dose (g ou mL p.c. ha ⁻¹)
Chlorimuron-ethyl	Classic	20	80
Diclosulam	Spider	25	30
Imazethapyr	Vezir	106	1000
Flumioxazin	Flumyzin	60	120
Fomesafen	Flex	375	1500
Sulfentrazone	Boral	600	1200
Clomazone	Gamit 500	800	1600
Isoxaflutole	Provence	60	80
Pendimethalin	Herbadox	1250	2500
S-metolachlor	Dual Gold	1728	1750
Trifluralin	Trifluralin Nortox	1800	4000
Amicarbazone	Dinamic	280	400
Atrazine	Atrazine 500	2000	4000
Diuron	Diuron Nortox 500	2000	4000
Metribuzin	Sencor	480	1000
[flumioxazin+imazethapyr]	Zethamaxx	[50+100]	500
Testemunha sem herbicida	-	-	-

*Produtos entre colchetes representam mistura formulada de fábrica.

Aos 20, 35 e 50 dias após a aplicação (DAA), foram realizadas avaliações de porcentagem de controle e número de plantas emergidas por vaso. Para a porcentagem de controle, foi utilizada escala em que 0% corresponde à ausência de injúrias e 100% à morte das plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA), e as médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pós-emergência (Experimentos 2, 3 e 4)

Inicialmente, as sementes de capim pé-de-galinha foram semeadas em bandejas com volume de 25 mL por célula. No momento em que as plântulas apresentavam uma folha verdadeira, foi realizado o transplante de duas plântulas por vaso. Durante a condução dos experimentos, os vasos foram irrigados diariamente, mantendo o solo próximo a sua capacidade de campo.

Os tratamentos foram constituídos de herbicidas recomendados para aplicação em pós-emergência em diferentes situações: Experimento 2 - herbicidas visando dessecação pré-plantio da soja ou do milho (Tabela 11), Experimento 3 - herbicidas inibidores da ACCase

isolados ou associados ao glyphosate visando aplicações dentro da cultura da soja (Tabela 12) e Experimento 4 - herbicidas recomendados para a cultura do milho com ou sem glyphosate (Tabela 13).

Tabela 11. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 2.

Nome comum	Produto comercial	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)	Dose (L p.c. ha ⁻¹)
Paraquat ^{1/}	Gramoxone	240	1,2
Paraquat ^{1/}	Gramoxone	400	2,0
[Paraquat + diuron] ^{1/}	Gramocil	[400 + 200]	2,0
[Paraquat + diuron] ^{1/}	Gramocil	[600 + 300]	3,0
Amônio glufosinato ^{2/}	Finale	400	2,0
Amônio glufosinato ^{2/}	Finale	600	3,0
Glyphosate + amônio glufosinato ^{2/}	Roundup Transorb + Finale	(960 + 400)	2,0 + 2,0
Glyphosate + amônio glufosinato ^{2/}	Roundup Transorb + Finale	(960 + 600)	2,0 + 3,0
Testemunha sem herbicida	-	-	-

^{1/}Adicionado espalhante adesivo (0,5% v/v); ^{2/}Adicionado óleo vegetal (0,2% v/v).

Tabela 12. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 3.

Nome comum	Nome comercial	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)	Dose (L p.c. ha ⁻¹)
Clethodim ^{1/}	Select	108	0,45
Clethodim ^{1/}	Select	192	0,8
Haloxifop ^{1/}	Verdict	60	0,5
Haloxifop ^{1/}	Verdict	120	1,0
Quizalofop-tefuri ^{2/}	Panther	72	0,6
Quizalofop-tefuri ^{2/}	Panther	120	1,0
Quizalofop-methyl	Targa	75	1,5
Quizalofop-methyl	Targa	100	2,0
Fluazifop ^{1/}	Fusilade	250	1,0
Fluazifop ^{1/}	Fusilade	500	2,0
Fenoxaprop	Podium	110	1,0
Fenoxaprop	Podium	220	2,0
Sethoxydim ^{1/}	Poast	184	1,0
Sethoxydim ^{1/}	Poast	368	2,0
Glyphosate + clethodim ^{1/}	Roundup Transorb + Select	(960 + 108)	2,0 + 0,45
Glyphosate + clethodim ^{1/}	Roundup Transorb + Select	(960 + 192)	2,0 + 0,8
Glyphosate + haloxifop ^{1/}	Roundup Transorb + Verdict	(960 + 60)	2,0 + 0,5
Glyphosate + haloxifop ^{1/}	Roundup Transorb + Verdict	(960 + 120)	2,0 + 1,0
Glyphosate + quizalofop-tefuri ^{2/}	Roundup Transorb + Panther	(960 + 72)	2,0 + 0,6
Glyphosate + quizalofop-tefuri ^{2/}	Roundup Transorb + Panther	(960 + 120)	2,0 + 1,0
Glyphosate + quizalofop-methyl	Roundup Transorb + Targa	(960 + 75)	2,0 + 1,5
Glyphosate + quizalofop-methyl	Roundup Transorb + Targa	(960 + 100)	2,0 + 2,0
Glyphosate + fluazifop ^{1/}	Roundup Transorb + Fusilade	(960 + 250)	2,0 + 1,0
Glyphosate + fluazifop ^{1/}	Roundup Transorb + Fusilade	(960 + 500)	2,0 + 1,0
Glyphosate + fenoxaprop	Roundup Transorb + Podium	(960 + 110)	2,0 + 1,0
Glyphosate + fenoxaprop	Roundup Transorb + Podium	(960 + 220)	2,0 + 2,0
Glyphosate + sethoxydim ^{1/}	Roundup Transorb + Poast	(960 + 184)	2,0 + 1,0
Glyphosate + sethoxydim ^{1/}	Roundup Transorb + Poast	(960 + 368)	2,0 + 2,0
Glyphosate	Roundup Transorb	960	2,0
Glyphosate	Roundup Transorb	1920	4,0
Testemunha sem herbicida	-	-	-

^{1/}Adicionado óleo mineral (0,5% v/v); ^{2/}Adicionado óleo mineral (1,0% v/v)

Tabela 13. Nome comum, nome comercial e respectivas doses dos tratamentos avaliados no Experimento 4.

Nome comum	Nome comercial	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)	Dose (L p.c. ha ⁻¹)
Atrazine ^{1/}	Proof	1500	3,0
Mesotrione ^{1/}	Callisto	120	0,25
Mesotrione ^{1/}	Callisto	192	0,4
Tembotrione ^{2/}	Soberan	75,6	0,18
Tembotrione ^{2/}	Soberan	105	0,24
Nicosulfuron	Sanson	50	1,25
Nicosulfuron	Sanson	60	1,5
Atrazine + mesotrione ^{1/}	Proof + Callisto	(1500 + 120)	3,0 + 0,25
Atrazine + mesotrione ^{1/}	Proof + Callisto	(1500 + 192)	3,0 + 0,4
Atrazine + tembotrione ^{2/}	Proof + Soberan	(1500 + 75,6)	3,0 + 0,18
Atrazine + tembotrione ^{2/}	Proof + Soberan	(1500 + 105)	3,0 + 0,24
Atrazine + mesotrione + nicosulfuron ^{1/}	Proof + Callisto + Sanson	(1500 + 120 + 6)	3,0 + 0,25 + 0,15
Atrazine + tembotrione + nicosulfuron ^{2/}	Proof + Soberan + Sanson	(1500 + 180 + 6)	3,0 + 0,18 + 0,15
Glyphosate	Roundup Transorb	960	2,0
Glyphosate + atrazina ^{1/}	Roundup Transorb + Proof	(960 + 1500)	2,0 + 3,0
Glyphosate + mesotrione ^{1/}	Roundup Transorb + Callisto	(960 + 120)	2,0 + 0,25
Glyphosate + mesotrione ^{1/}	Roundup Transorb + Callisto	(960 + 192)	2,0 + 0,4
Glyphosate + tembotrione ^{2/}	Roundup Transorb + Soberan	(960 + 75,6)	2,0 + 0,18
Glyphosate + tembotrione ^{2/}	Roundup Transorb + Soberan	(960 + 105)	2,0 + 0,24
Glyphosate + nicosulfuron	Roundup Transorb + Sanson	(960 + 50)	2,0 + 1,25
Glyphosate + nicosulfuron	Roundup Transorb + Sanson	(960 + 60)	2,0 + 1,5
Testemunha sem herbicida	-	-	-

^{1/}Adicionado óleo mineral (0,5% v/v); ^{2/}Adicionado óleo vegetal (0,5% v/v)

Em todos os experimentos de pós-emergência foram avaliados dois estádios de aplicação (E1 - 1 perfilho e E2 - 4 perfilhos). O equipamento de aplicação e suas configurações foram os mesmos descritos no Experimento 1. As condições climáticas encontradas no momento das aplicações em pós-emergência foram: Temp. = 23°C; UR = 78%; velocidade do vento = 1,2 km h⁻¹. Aos 14 e 28 DAA foi avaliada a porcentagem de controle utilizando escala de 0-100%. Os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pré-emergência – Experimento 1

Na primeira avaliação de 20 dias após a aplicação (20 DAA), os tratamentos fomesafen, sulfentrazone, clomazone, isoxaflutole, pendimethalin, s-metolachlor, trifluralin e [flumioxazin + imazethapyr] proporcionaram mais de 93% de controle (Tabela 14). Flumioxazin e diuron e também apresentaram controle residual satisfatórios nesta avaliação (>80%). O elevado controle residual destes herbicidas foi observado pelo baixo número ou ausência de plantas emergidas nestes tratamentos e pelo menor desenvolvimento das plantas sobreviventes. Mesmo que o controle proporcionado por chlorimuron, diclosulam, amicarbazone, atrazine, diuron e metribuzin ter sido baixo aos 20 DAA, foi observado menor número de plantas emergidas nestes tratamentos quando comparados à testemunha.

Tabela 14. Porcentagem de controle (%) e número de plantas emergidas por vaso (NP) de capim pé-de-galinha após a aplicação de herbicidas em pré-emergência, em três avaliações (DAA – dias após a aplicação).

Tratamentos*	Dose (g i.a. ha ⁻¹)	20 DAA		35 DAA		60 DAA	
		%	NP	%	NP	%	NP
Chlorimuron-ethyl	20	11,3 f	15,3 c	6,3 f	43,8 b	31,3 e	25,5 d
Diclosulam	25	22,5 e	23,8 b	41,3 d	43,8 b	30,0 e	44,0 b
Imazethapyr	106	18,8 e	50,0 a	40,0 d	52,5 a	51,3 d	35,8 c
Flumioxazin	60	81,3 b	5,8 d	72,5 b	19,0 d	61,3 c	18,0 d
Fomesafen	375	100,0 a	0,0 d	75,0 b	10,3 e	67,5 c	19,3 d
Sulfentrazone	600	100,0 a	0,0 d	97,0 a	2,3 e	94,5 a	3,5 e
Clomazone	800	100,0 a	0,0 d	92,3 a	8,8 e	77,5 b	18,3 d
Isoxaflutole	60	99,5 a	0,8 d	62,5 c	28,3 c	65,0 c	23,5 d
Pendimethalin	1250	100,0 a	0,0 d	100,0 a	0,0 e	100,0 a	0,0 e
S-metolachlor	1728	100,0 a	0,0 d	100,0 a	0,0 e	100,0 a	0,0 e
Trifluralin	1800	100,0 a	0,0 d	96,0 a	4,3 e	96,5 a	6,8 e
Amicarbazone	280	30,0 d	16,0 c	45,0 d	40,0 c	51,3 d	31,3 c
Atrazine	2000	21,3 e	15,8 c	26,3 e	32,8 c	25,0 e	27,5 c
Diuron	2000	80,0 b	15,3 c	79,3 b	15,5 d	77,8 b	15,3 d
Metribuzin	480	42,5 c	15,0 c	66,3 c	19,8 d	57,5 d	21,3 d
[Flumioxazin + imazethapyr]	[50 + 100]	93,8 a	1,3 d	78,0 b	22,8 d	79,5 b	21,8 d
Testemunha	-	0,0 g	47,0 a	0,0 f	55,0 a	0,0 f	57,5 a
F		327,6	28,2	124,7	23,2	131,9	47,6
CV		6,8	47,2	8,7	32,7	7,4	21,5

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Aos 35 DAA, os herbicidas que ainda mantiveram altos níveis de controle residual (>90%) e baixo número de plantas emergidas (<10 plantas) foram sulfentrazone, clomazone, pendimethalin, s-metolachlor e trifluralin. Os herbicidas flumioxazin, fomesafen, diuron e [flumioxazin + imazethapyr] proporcionaram controle na faixa de 70-80%, enquanto que isoxaflutole e metribuzin apresentaram supressão de 60-66%. Os demais herbicidas proporcionaram menos de 45% de controle e baixa supressão da emergência de plantas de capim pé-de-galinha.

Na avaliação de 60 DAA, os herbicidas que ainda apresentavam elevados níveis de controle residual eram sulfentrazone, pendimethalin, s-metolachlor e trifluralin. Para estes tratamentos, o controle foi acima de 94% e o número de plantas emergidas menor que sete. Em segundo nível de eficácia, clomazone, diuron e [flumioxazin + imazethapyr] apresentaram controle de 77 a 80%. Em terceiro nível de eficácia, os herbicidas flumioxazin, fomesafen e isoxaflutole proporcionaram controle entre 60-68%. Os demais herbicidas apresentaram baixa eficácia no controle de capim pé-de-galinha.

Os resultados deste experimento corroboram com diversos trabalhos na literatura. McCullough et al. (2013) observaram que a aplicação de 420 g ha⁻¹ de sulfentrazone em pré-emergência exerceu controle de capim pé-de-galinha acima de 90%. Molin et al. (2013) e Takano et al. (2016b) verificaram que pendimethalin (1120 g ha⁻¹) e s-metolachlor (1120 g ha⁻¹) aplicados em pré-emergência proporcionaram 100% de controle desta espécie aos 14 DAA.

No caso da soja e do milho, uma vez que a aplicação do herbicida em pré-emergência é realizada no momento da semeadura, o controle residual até 20 DAA pode ser suficiente para manter a cultura no limpo entre a semeadura e a aplicação em pós-emergência. Mesmo que o controle residual de alguns herbicidas seja menor após 35 ou 60 DAA, a supressão imposta por estes produtos permite que a aplicação em pós-emergência seja em uma situação mais tranquila (menor infestação e plantas em estágio inicial de crescimento). Um outro ponto importante, é que a utilização de herbicidas residuais será determinante para o manejo de populações de capim pé-de-galinha resistentes ao glyphosate. Neste presente trabalho, pelo menos cinco mecanismos de ação diferentes e alternativos ao glyphosate foram eficazes em pré-emergência.

Considerando todos estes aspectos, dentre os herbicidas avaliados neste experimento, sulfentrazone, pendimethalin, s-metolachlor e trifluralin foram os herbicidas com maior eficácia. No entanto, flumioxazin, fomesafen, clomazone, isoxaflutole, diuron e [flumioxazin

+ imazethapyr] também podem ser utilizados no controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate em pré-emergência.

Pós-emergência – Experimento 2

Para plantas com um perfilho, os herbicidas paraquat e [paraquat + diuron] proporcionaram porcentagens de controle acima de 95% e foram agrupados em nível de controle acima dos demais tratamentos na avaliação de 14 DAA (Tabela 15). Os tratamentos com doses de 600 g ha⁻¹ de amônio glufosinato isolado ou associado ao glyphosate apresentaram maiores níveis de controle do que aqueles com doses menores. No entanto, nenhum tratamento com amônio glufosinato foi eficaz no controle de capim pé-de-galinha. Aos 28 DAA, foi observada a mesma tendência da avaliação anterior. Apesar disso, o tratamento com a menor dose de paraquat proporcionou menores níveis de controle que a maior dose deste herbicida e que os tratamentos com [paraquat + diuron], apresentando rebrotes da parte aérea nas plantas deste tratamento.

Tabela 15. Porcentagem de controle de capim pé-de-galinha em dois estádios (E1 – 1 perfilho e E2 – 4 perfilhos) após a aplicação de herbicidas visando dessecação pré-plantio, em duas avaliações (DAA - dias após a aplicação).

Tratamentos*	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)	Porcentagem de controle (%)			
		E1		E2	
		14 DAA	28 DAA	14 DAA	28 DAA
Paraquat	240	98,5 a	87,5 b	27,5 c	1,3 e
Paraquat	400	100,0 a	100,0 a	88,8 a	81,3 b
[Paraquat + diuron]	[400 + 200]	100,0 a	100,0 a	93,8 a	87,5 b
[Paraquat + diuron]	[600 + 300]	100,0 a	100,0 a	99,5 a	99,8 a
Amônio glufosinato	400	42,5 d	22,3 d	35,0 c	27,5 d
Amônio glufosinato	600	66,3 b	40,0 c	64,5 b	40,0 c
Glyphosate + amônio glufosinato	(960 + 400)	58,8 c	22,5 d	40,0 c	22,5 d
Glyphosate + amônio glufosinato	(960 + 600)	66,3 b	47,5 c	68,8 b	41,3 c
Testemunha	-	0,0 e	0,0 e	0,0 d	0,0 e
F		361,4	161,1	134,3	80,4
CV		5,1	11,9	9,39	14,8

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para plantas com quatro perfilhos, a menor dose de paraquat, assim como todos os tratamentos com amônio glufosinato foram pouco eficazes no controle de capim pé-de-galinha aos 14 DAA. A maior dose de paraquat e os tratamentos com [paraquat + diuron]

apresentaram níveis de controle acima de 85%. Na avaliação de 28 DAA, o tratamento com [600 + 300] g ha⁻¹ de [paraquat + diuron] proporcionou controle superior aos demais. Em um segundo nível de eficácia, a maior dose de paraquat e a menor dose de [paraquat + diuron] também proporcionaram bom controle (81-87%). Nenhum tratamento com amônio glufosinato proporcionou eficácia.

A baixa eficácia de amônio-glufosinato sobre capim pé-de-galinha, especialmente para plantas em estágio de desenvolvimento avançado também é relatada em outros trabalhos (Culpepper & York, 1999; Culpepper et al., 2000). Nestes trabalhos, o controle máximo proporcionado pelo amônio-glufosinato (490 g ha⁻¹) é de 60% em plantas com 4-8 folhas. Molin et al. (2013) também verificaram que a aplicação de paraquat (840 g ha⁻¹) proporcionou 100% de controle em plantas pequenas (5-8 cm).

Ambas as doses dos herbicidas paraquat e [paraquat + diuron] foram eficazes para o controle de capim pé-de-galinha com um perfilho. Paraquat (600 g ha⁻¹) e ambas as doses de [paraquat + diuron] controlaram plantas com até quatro perfilhos em mais de 80%. Estes herbicidas possuem recomendação para aplicação em dessecação pré-plantio tanto para a cultura da soja quanto para a cultura do milho (Agrofit, 2016), sendo alternativas viáveis para a semeadura das culturas no limpo.

Pós-emergência – Experimento 3

Os herbicidas clethodim, haloxifop, quizalofop-tefuril, quizalofop-methyl e fluazifop em ambas as doses proporcionaram 100% de controle de capim pé-de-galinha com um perfilho logo aos 14 DAA (Tabela 16). Por outro lado, mesmo estando agrupados entre os tratamentos de melhor controle, estes herbicidas associados ao glyphosate não apresentaram 100% de controle. Fenoxaprop (200 g ha⁻¹) e glyphosate + fluazifop (960 + 500 g ha⁻¹) também foram agrupados neste mesmo grupo, proporcionando controle acima de 95%. Fenoxaprop (110 g ha⁻¹), Sethoxidim em ambas as doses, glyphosate + fluazifop (960 + 250 g ha⁻¹) e glyphosate + sethoxydim (960 + 368 g ha⁻¹) apresentaram controle satisfatório. Nesta avaliação, glyphosate isolado em ambas as doses, glyphosate + fenoxaprop em ambas as doses e glyphosate + sethoxydim (960 + 184 g ha⁻¹) foram ineficazes no controle de capim pé-de-galinha com um perfilho.

Tabela 16. Porcentagem de controle de capim pé-de-galinha em dois estádios (E1 – 1 perfilho e E2 – 4 perfilhos) após a aplicação de diferentes herbicidas inibidores da ACCase isolados ou em associação com glyphosate (DAA – dias após a aplicação).

Tratamentos*	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)	Porcentagem de controle (%)			
		E1		E2	
		14 DAA	28 DAA	14 DAA	28 DAA
Clethodim	108	100,0 a	100,0 a	61,3 b	81,3 b
Clethodim	192	100,0 a	100,0 a	70,0 a	97,5 a
Haloxifop	60	100,0 a	100,0 a	57,5 b	82,5 b
Haloxifop	120	100,0 a	100,0 a	78,3 a	99,0 a
Quizalofop-tefuriil	72	100,0 a	100,0 a	62,5 b	87,0 b
Quizalofop-tefuriil	120	100,0 a	100,0 a	58,8 b	83,8 b
Quizalofop-methyl	75	100,0 a	100,0 a	55,0 b	75,3 c
Quizalofop-methyl	100	100,0 a	100,0 a	60,0 b	86,3 b
Fluazifop	250	100,0 a	100,0 a	55,0 b	71,3 c
Fluazifop	500	100,0 a	100,0 a	62,5 b	75,0 c
Fenoxaprop	110	86,8 b	100,0 a	52,5 b	63,8 d
Fenoxaprop	220	98,3 a	100,0 a	52,5 b	67,0 c
Sethoxydim	184	83,8 b	100,0 a	55,0 b	56,3 d
Sethoxydim	368	83,8 b	100,0 a	67,5 a	71,3 c
Glyphosate + clethodim	(960 + 108)	96,3 a	100,0 a	68,8 a	73,3 c
Glyphosate + clethodim	(960 + 192)	98,8 a	100,0 a	70,0 a	70,8 c
Glyphosate + haloxifop	(960 + 60)	99,8 a	100,0 a	62,5 b	73,3 c
Glyphosate + haloxifop	(960 + 120)	100,0 a	100,0 a	67,5 a	80,8 b
Glyphosate + quizalofop-tefuriil	(960 + 72)	95,0 a	100,0 a	63,8 b	73,8 c
Glyphosate + quizalofop-tefuriil	(960 + 120)	98,8 a	100,0 a	65,0 a	86,3 b
Glyphosate + quizalofop-methyl	(960 + 75)	99,3 a	100,0 a	63,8 b	63,8 d
Glyphosate + quizalofop-methyl	(960 + 100)	100,0 a	100,0 a	68,8 a	86,3 b
Glyphosate + fluazifop	(960 + 250)	93,3 b	97,0 a	70,0 a	87,8 b
Glyphosate + fluazifop	(960 + 500)	97,0 a	100,0 a	73,8 a	88,8 b
Glyphosate + fenoxaprop	(960 + 110)	61,3 d	37,5 d	62,5 b	72,5 c
Glyphosate + fenoxaprop	(960 + 220)	66,3 d	40,0 d	61,3 b	72,5 c
Glyphosate + sethoxymidim	(960 + 184)	70,0 c	62,5 c	60,0 b	61,3 d
Glyphosate + sethoxymidim	(960 + 368)	83,3 b	100,0 a	67,5 a	70,0 c
Glyphosate	960	62,5 d	60,0 c	36,3 c	43,8 e
Glyphosate	1920	70,0 c	70,0 b	63,8 b	55,0 d
Testemunha	-	0,0 e	0,0 e	0,0 d	0,0 f
F		79,5	117,6	10,1	17,9
CV		5,2	5,1	14,3	12,5

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Aos 28 DAA, os herbicidas clethodim, haloxyfop, quizalofop-tefuril, quizalofop-methyl e fluazifop, aplicados isolados ou em associação com glyphosate, haviam proporcionado controle acima de 96%. Por outro lado, fenoxaprop e sethoxidim controlaram as plantas de capim pé-de-galinha somente quando foram aplicados isolados. A mistura de ambas as doses de fenoxaprop com glyphosate, bem como a menor dose de sethoxidim, proporcionaram controle semelhante ou inferior ao nível de controle destes herbicidas quando aplicados isoladamente. Ambas as doses de glyphosate aplicado isoladamente não foram eficazes no controle de capim pé-de-galinha.

Nenhum tratamento proporcionou controle satisfatório para as aplicações em estágio de quatro perfilhos (E2) aos 14 DAA. No entanto, para a avaliação de 28 DAA, os herbicidas clethodim (192 g ha⁻¹) e haloxyfop (120 g ha⁻¹) foram os que proporcionaram maiores níveis de controle (>97%). Os tratamentos clethodim (108 g ha⁻¹), haloxyfop (60 g ha⁻¹), quizalofop-tefuril (ambas as doses), quizalofop-methyl (100 g ha⁻¹), glyphosate + haloxyfop (960 + 120 g ha⁻¹), glyphosate + quizalofop-tefuril (960 + 120 g ha⁻¹) e glyphosate + fluazifop (ambas as doses) proporcionaram controle entre 80 e 90%, sendo enquadrados em um segundo nível de eficácia. Os demais tratamentos não foram eficazes no controle de capim pé-de-galinha com quatro perfilhos.

Em concordância com os resultados deste experimento, trabalhos na literatura mostram que aplicações de clethodim, haloxyfop e fluazifop em capim pé-de-galinha com até dois perfilhos apresentam controle acima de 90% (Barroso et al., 2010; Molin et al., 2013; Ulguim et al., 2013). Por outro lado, sethoxidim (230 g ha⁻¹) e [clethodim + fenoxaprop] [50 + 50 g ha⁻¹] proporcionaram controle final abaixo de 80% quando aplicados sobre plantas com dois a quatro perfilhos (Barroso et al., 2010).

De modo geral, a maioria dos herbicidas inibidores da ACCase aplicados isolados proporcionou controle maior ou semelhante àquele obtido pela associação destes herbicidas com glyphosate. No caso de plantas pequenas (um perfilho – E1), exceto para fenoxaprop e sethoxidim, mesmo sendo o controle mais lento, a associação destes graminicidas com glyphosate foi eficaz. Por outro lado, em plantas maiores (quatro perfilhos - E2), o controle final de capim pé-de-galinha foi limitado na maioria dos casos, especialmente em associações com glyphosate. Mesmo os herbicidas inibidores da ACCase apresentando eficácia sobre a população de capim pé-de-galinha utilizada neste experimento, é importante lembrar que outras populações resistentes a este mecanismo de ação já foram documentadas no Brasil

(Vidal et al., 2006). Portanto, a utilização destes herbicidas deve ser feita de maneira racional, visando à preservação da sua eficácia sobre a espécie.

Dentre os herbicidas avaliados neste experimento, glyphosate isolado apresentou no máximo 70% de controle em plantas pequenas e 55% de controle em plantas grandes. Todos os gramínicos isolados ou associados ao glyphosate apresentaram eficácia acima de 80% sobre capim pé-de-galinha com um perfilho, com exceção de glyphosate + fenoxaprop (960 + 110 e 960 + 220 g ha⁻¹) e glyphosate + sethoxidim (960 + 384 g ha⁻¹). Para plantas com quatro perfilhos, as únicas opções eficazes foram clethodim (108 e 192 g ha⁻¹), haloxyfop (60 e 120 g ha⁻¹), quizalofop-tefuril (70 e 120 g ha⁻¹), quizalofop-methyl (75 e 100 g ha⁻¹), glyphosate + haloxyfop (960 + 120 g ha⁻¹), glyphosate + quizalofop-tefuril (960 + 120 g ha⁻¹), glyphosate + quizalofop-methyl (960 + 100 g ha⁻¹), glyphosate + fluazifop (960 + 250 e 960 + 500 g ha⁻¹). Todos estes herbicidas são registrados para aplicação em pós-emergência da soja convencional ou da soja RR[®] (Agrofit, 2016), podendo ser recomendados para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate dentro da cultura.

Pós-emergência – Experimento 4

Para plantas de capim pé-de-galinha com um perfilho (E1), os tratamentos agrupados no grupo de maior nível de controle aos 14 DAA foram: atrazine + mesotrione, atrazine + mesotrione, atrazine + tembotrione, atrazine + tembotrione, atrazine + mesotrione + nicosulfuron e atrazine + tembotrione + nicosulfuron (Tabela 17). Estes tratamentos proporcionaram 100% de controle nesta avaliação, enquanto que os demais apresentaram níveis de controle abaixo de 80%. Nesta avaliação, em segundo nível de eficácia estão os herbicidas mesotrione (192 g ha⁻¹), nicosulfuron (ambas as doses), glyphosate + atrazina (960 + 1500 g ha⁻¹), glyphosate + mesotrione (960 + 192 g ha⁻¹) e glyphosate + nicosulfuron (ambas as doses).

Tabela 17. Porcentagem de controle de capim pé-de-galinha em dois estádios (E1 – 1 perfilho e E2 – 4 perfilhos) após a aplicação de diferentes herbicidas em pós-emergência, utilizados na cultura do milho (DAA - dias após a aplicação)

Tratamentos*	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)	Porcentagem de controle (%)			
		E1		E2	
		14 DAA	28 DAA	14 DAA	28 DAA
Atrazine	1500	55,0 c	25,0 d	35,0 c	38,8 d
Mesotrione	120	57,5 c	17,5 d	32,5 c	32,5 d
Mesotrione	192	68,8 b	33,8 c	37,5 c	20,0 d
Tembotrione	75,6	53,8 c	17,5 d	32,5 c	32,5 d
Tembotrione	105	58,8 c	27,5 d	36,3 c	31,3 d
Nicosulfuron	50	65,0 b	87,5 a	47,5 b	65,0 b
Nicosulfuron	60	70,0 b	92,3 a	55,0 b	67,5 b
Atrazine + mesotrione	(1500 + 120)	100,0 a	100,0 a	56,3 b	67,5 b
Atrazine + mesotrione	(1500 + 192)	100,0 a	100,0 a	66,3 a	63,8 b
Atrazine + tembotrione	(1500 + 75,6)	100,0 a	100,0 a	57,5 b	52,5 c
Atrazine + tembotrione	(1500 + 105)	100,0 a	100,0 a	75,8 a	71,3 a
Atrazine + mesotrione + nicosulfuron	(1500 + 120 + 6)	100,0 a	100,0 a	70,0 a	62,5 b
Atrazine + tembotrione + nicosulfuron	(1500 + 180 + 6)	100,0 a	100,0 a	73,8 a	63,8 b
Glyphosate	960	52,5 c	45,0 c	47,5 b	50,0 c
Glyphosate + atrazina	(960 + 1500)	61,3 b	51,3 b	20,0 c	30,0 d
Glyphosate + mesotrione	(960 + 120)	55,0 c	40,0 c	35,0 c	47,5 c
Glyphosate + mesotrione	(960 + 192)	62,5 b	56,3 b	48,8 b	56,3 c
Glyphosate + tembotrione	(960 + 75,6)	51,3 c	40,0 c	35,0 c	32,5 d
Glyphosate + tembotrione	(960 + 105)	55,0 c	50,0 b	36,3 c	30,0 d
Glyphosate + nicosulfuron	(960 + 50)	63,8 b	92,5 a	60,0 b	73,8 a
Glyphosate + nicosulfuron	(960 + 60)	67,5 b	94,8 a	66,3 a	80,8 a
Testemunha	-	0,0 d	0,0 e	0,0 d	0,0 e
F		80,9	50,3	15,1	27,4
CV		7,9	15,6	20,7	16,2

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Aos 28 DAA, além dos tratamentos contendo combinações de atrazine com mesotrione, tembotrione e nicosulfuron, a aplicação de nicosulfuron isolado ou associado a atrazine também controlou as plantas de capim pé-de-galinha acima de 85%. Atrazine, mesotrione e tembotrione isolados ou em mistura com glyphosate não foram eficazes. No entanto, o controle obtido com a aplicação da mistura desses herbicidas com o glyphosate foi maior do que a sua aplicação isolada.

Para plantas de quatro perfilhos (E2), nenhum tratamento proporcionou controle acima de 80% na avaliação de 14 DAA. As maiores porcentagens de controle foram

observadas nos tratamentos com atrazine + mesotrione (1500 + 192 g ha⁻¹), atrazine + tembotrione (1500 + 105 g ha⁻¹), atrazine + mesotrione + nicosulfuron (1500 + 120 + 150 g ha⁻¹), atrazine + tembotrione + nicosulfuron (1500 + 180 + 150 g ha⁻¹) e glyphosate + nicosulfuron (960 + 60 g ha⁻¹).

Aos 28 DAA, o tratamento glyphosate + nicosulfuron (960 + 60 g ha⁻¹) proporcionou controle de capim pé-de-galinha em 80,8%. As misturas de atrazine + tembotrione (1500 + 105 g ha⁻¹) e glyphosate + nicosulfuron (960 + 50 g ha⁻¹) foram agrupados no mesmo nível deste tratamento e proporcionaram controle de 71,3 e 73,8% respectivamente. A porcentagem de controle apresentada pelos herbicidas nicosulfuron, atrazine + mesotrione, atrazine + mesotrione + nicosulfuron e atrazine + tembotrione + nicosulfuron foi de aproximadamente 65%, sendo estes herbicidas classificados em segundo nível de eficácia. Os demais tratamentos apresentaram controle final abaixo de 60%.

Em concordância com estes resultados, Takano et al. (2016b) também verificaram controle de capim pé-de-galinha acima de 80% após a aplicação de atrazine + mesotrione (2000 + 100 g ha⁻¹), atrazine+tembotrione (2000 + 75 g ha⁻¹) e atrazine + nicosulfuron (2000 + 50 g ha⁻¹). Estes autores observaram ainda que a aplicação destes herbicidas isoladamente não apresenta eficácia sobre esta espécie.

Dentre os herbicidas avaliados neste experimento, nicosulfuron (50 e 60 g ha⁻¹), glyphosate + nicosulfuron (960 + 50 e 960 + 60 g ha⁻¹), bem como todas as associações de atrazine com mesotrione, tembotrione e nicosulfuron foram eficazes no controle de plantas com um perfilho. Por outro lado, em plantas com quatro perfilhos o único tratamento que proporcionou controle satisfatório ($\geq 80\%$) foi glyphosate + nicosulfuron (960 + 60 g ha⁻¹). Mesmo que estes herbicidas sejam recomendados para a cultura do milho (Agrofit, 2016), o controle de capim pé-de-galinha em estágio avançado se torna bastante limitado nesta cultura, especialmente em lavouras convencionais (não RR[®]).

De forma generalizada, em todos os experimentos de pós-emergência, o número de opções de tratamentos eficazes para o controle de capim pé-de-galinha com quatro perfilhos foi sempre menor do que para plantas com um perfilho. Para esta espécie, o tempo entre a emergência e o início do perfilhamento é de apenas 9 dias, o que significa pouco tempo para que a aplicação seja feita no estágio adequado (Takano et al., 2016a). Existe uma hipótese importante para explicar a menor eficácia de herbicidas sobre plantas de capim pé-de-galinha em estágio avançado. A cutícula de indivíduos com mais de três perfilhos apresenta maior acúmulo de ceras, o que pode limitar a absorção pela planta. Estas ceras atuam como um

compartimento de acúmulo de herbicidas e, portanto, impedem parcialmente a entrada do ingrediente ativo em células epidérmicas e conseqüentemente no floema (Chamel & Vitton, 1996; Malpassi, 2006). Neste sentido, para o controle efetivo de plantas de capim pé-de-galinha em estágio avançado, aplicações complementares ou aplicações sequenciais são necessárias (Wiecko, 2000).

Outro fato importante observado neste trabalho é que diferentemente do capim-amargoso, as misturas de glyphosate com herbicidas inibidores da ACCase, aparentemente, apresentam efeito antagonismo no controle de capim pé-de-galinha. A associação destes herbicidas constitui uma das principais ferramentas para o controle de capim-amargoso resistente ao glyphosate (Gemelli et al., 2012). Neste sentido, estudos sobre a resposta de capim pé-de-galinha à aplicação destes herbicidas e respectivas doses utilizadas são necessários.

Neste trabalho, foram apresentadas diversas opções de herbicidas eficazes para aplicação em pré ou em pós-emergência de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate. A utilização de herbicidas residuais é determinante para o manejo desta espécie, uma vez que a maioria dos herbicidas aplicados em pós-emergência controlam apenas plantas pequenas. A rotação de mecanismos de ação de herbicidas, bem como misturas destes produtos geralmente apresentam efeito retardador na seleção de populações resistentes, especialmente para espécies que são autopolinizadas, que possuem mecanismo de resistência baseado em alteração no sítio de ação e a dispersão de suas sementes é restrita (Beckie & Reboud, 2009). Esta série de características adequam-se justamente ao capim pé-de-galinha, que é uma espécie autógama, cuja dispersão de sementes é estritamente por sementes e o mecanismo de resistência ao glyphosate é uma mutação no gene da EPSPS (conforme descrito no Capítulo 3).

Portanto, herbicidas alternativos ao glyphosate eficazes no controle de capim pé-de-galinha podem ser recomendados em sistemas de rotação de mecanismos de ação visando ao manejo deste caso de resistência. Além da rotação de mecanismos de ação de herbicidas, outros métodos de controle devem ser considerados para evitar a seleção de resistência múltipla a curto prazo. O uso de culturas de cobertura (Adler & Chase, 2007), a descompactação do solo (McCollough et al., 2016) e o rápido fechamento de entrelinhas (Arrieta et al., 2009) são métodos alternativos aos herbicidas que também diminuem a infestação destas plantas na lavoura.

CONCLUSÕES

O uso de herbicidas residuais para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate constitui uma ferramenta de extrema importância para o seu manejo efetivo. O estágio de aplicação é determinante para se obter eficácia em pós-emergência (no máximo um perfilho). Paraquat e [paraquat+diuron] são eficazes no controle desta espécie. Os herbicidas inibidores da ACCase isolados foram mais eficazes que as suas associações com glyphosate, especialmente em plantas com quatro perfilhos. Os inibidores da síntese de carotenoides apresentaram elevado sinergismo com atrazine e não com glyphosate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M.J.; CHASE, C.A. Comparison of the allelopathic potential of leguminous summer cover crops: cowpea, sunn hemp, and velvetbean. **Hortscience**, v.42, n.2, p.289–293, 2007.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Consultado em: 12 de Dezembro de 2016.
- ARRIETA, C.; BUSEY, P.; DAROUB, S.H. Goosegrass and bermudagrass competition under compaction. **Agronomy Journal**, v.101, n.1, p.11–16, 2009.
- BARROSO, A.L.L. et al. Eficácia de herbicidas inibidores da ACCase no controle de gramíneas em lavouras de soja. **Planta Daninha**, v.28, n.1, p.149-157, 2010.
- BECKIE, H.J.; REBOUD, X. Selecting for weed resistance: herbicide rotation and mixture. **Weed Technology**, v.23, n.3, p.363-370, 2009.
- CHAMEL, A.; VITTON, N. Sorption and diffusion of ¹⁴C-atrazine through isolated plant cuticles. **Chemosphere**, v.33, n.6, p.995-1003, 1996.
- CHAUHAN, B.S.; JOHNSON, D.E. Germination ecology of goosegrass (*Eleusine indica*): an important grass weed of rainfed rice. **Weed Science**, v.56, n.5, p.699-706, 2008.
- BROSNAN, J.T.; NISHIMOTO, R.K.; DEFRANK, J. Metribuzin-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in bermudagrass turf. **Weed Technology**, v.22, n.4, p.675–678, 2008.
- BUKER, R.S.; STEED, T.; STALL, W.M. Confirmation and control of paraquat-tolerant goosegrass (*Eleusine indica*) biotype. **Weed Technology**, v.16, n.2, p.309–313, 2002.
- CULPEPPER, A.S.; YORK, A.C. Weed management in glufosinate resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v.13, n.2, p.324–333, 1999.
- CULPEPPER, A.S. et al. Weed management in glufosinate- and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v.14, n.1, p.77-88, 2000.
- GEMELLI, A. et al. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.11, n.2, p.231-240, 2012.
- ISMAIL, B.S. et al. Germination and seedling emergence of glyphosate-resistant and susceptible biotypes of goosegrass (*Eleusine indica* [L.] Gaertn.). **Weed Biology and Management**, v.2, n.4, p.177–185, 2002.
- JALALUDIN, A. et al. Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. **Weed Biology and Management**, v.10, n.4, p.256–260, 2010.
- JOHNSON, W.G.; GIBSON, K.D. Glyphosate-resistant weeds and resistance management strategies: an Indiana grower perspective. **Weed Technology**, v.20, n.3, p.768-772, 2006.
- LEE, L.J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. **Pest Management Science**, v.56, n.4, p.336–339, 2000.

- MALPASSI, R.N. Herbicide effects on cuticle ultrastructure in *Eleusine indica* and *Portulaca oleracea*. **Biocell**, v.30, n.1, p.51-56, 2006.
- MCCULLOUGH, P.E.; YU, J.; BARREDA, D.G. Efficacy of preemergence herbicides for controlling a dinitroaniline-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Georgia. **Weed Technology**, v.27, n.4, p.639-644, 2013.
- MCCULLOUGH, P.E. et al. First report of ACCase-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. **Weed Science**, v.64, n.3, p.399-408, 2016.
- MOLIN, W.T.; WRIGHT, A.A.; NANDULA, V.K. Glyphosate-Resistant Goosegrass from Mississippi. **Agronomy**, v.3, n.2, p.474-487, 2013.
- MUDGE, L.C.; GOSSETT, B.J.; MURPHY, T.R. Resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to dinitroaniline herbicides. **Weed Science**, v.32, n.5, p.591-594, 1984.
- NORSWORTHY, J.K. et al. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, v.60, n.spe, p.31-62, 2012.
- POWLES, S.B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.360-365, 2008.
- SHANER, D.L. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. **Pest Management Science**, v.56, n.4, p.320-326, 2000.
- TAKANO, H.K. et al. Growth, development and seed production of goosegrass. **Planta Daninha**, v.34, n.1, p.249-258, 2016a.
- TAKANO, H.K. et al. Potential use of herbicides in different sorghum hybrids. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.26, p.2277-2285, 2016b.
- TAKANO, H.K. et al. Glyphosate resistance in goosegrass from Brazil. **Planta Daninha**, v.35, e017163071, 2017.
- ULGUIM, A.R. et al. Manejo de capim pé-de-galinha em lavouras de soja transgênica resistente ao glifosato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.17-24, 2013.
- VIDAL, R.A. et al. Resistência de *Eleusine indica* aos inibidores de ACCase. **Planta Daninha**, v.24, n.1, p.163-171, 2006.
- WIECKO, G. Sequential herbicide treatments for goosegrass (*Eleusine indica*) control in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) turf. **Weed Technology**, v.14, n.4, p.686-691, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

- O capim pé-de-galinha apresentou 80% de emergência aos 12 DAE.
- O ponto crítico de controle do capim pé-de-galinha ocorre aos 9 DAE, quando a planta inicia o perfilhamento.
- A produção de sementes inicia aos 38 DAE, totalizando mais de 120 mil sementes por planta no fim do seu ciclo que ocorre aos 120 DAE.
- Entre 38 e 43 DAE, a planta apresenta rápida emissão de novos perfilhos, acúmulo exponencial de massa seca total e aumento substancial da taxa de crescimento absoluto.
- Duas populações oriundas de Campo Mourão-PR e Luiziana-PR foram consideradas como o primeiro caso de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate no Brasil (FR=3,99-6,81).
- O estágio de um perfilho é mais adequado para estudos de dose resposta nesta espécie.
- A diferença no acúmulo de chiquimato foi de até sete vezes maior em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis.
- O mecanismo que confere a resistência está associado a um ponto de mutação no gene da EPSPS (P106S) em plantas resistentes.
- A sonda TaqMan SNP foi validada como ferramenta rápida e eficaz para mapear populações resistentes em larga escala.
- O uso de herbicidas residuais para o controle de capim pé-de-galinha resistente ao glyphosate constitui uma ferramenta de extrema importância para o seu manejo efetivo.
- O estágio de aplicação é determinante para se obter eficácia em pós-emergência (no máximo um perfilho).
- Paraquat e [paraquat + diuron] são opções eficazes para dessecação de áreas com capim pé-de-galinha.
- Os herbicidas inibidores da ACCase isolados foram mais eficazes que as suas associações com glyphosate, especialmente em plantas com quatro perfilhos.
- Os inibidores da síntese de carotenoides apresentaram elevado sinergismo com atrazine e não com glyphosate.

ANEXO - Protocolo para Extração de DNA

1. Colocar 300 mg de folha macerada em N₂ líquido em Tubo Eppendorf de 2,0 ml (Tubo 1).
2. Adicionar 800 µL de solução tampão* recém preparada (à 65°C). Misturar bem.
3. Incubar à 65°C por 60 minutos. Misturar de 5 em 5 minutos.
4. Deixar à temperatura ambiente (25°C) por 5 minutos.
5. Adicionar 800 µL de clorofórmio: álcool isoamilico (24:1). Misturar durante 3 a 5 minutos.
6. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (25°C).
7. Transferir a fase aquosa (fase superior) para um Tubo de Eppendorf limpo (Tubo 2).
8. Adicionar 800 µL de clorofórmio: álcool isoamilico (24:1) e agitar 5 minutos.
9. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (4°C).
10. Transferir fase aquosa p/ Tubo de Eppendorf limpo.
11. Adicionar 300 µL de isopropanol. Misturar por inversão durante 1 minuto (o precipitado deve ser evidente). Manter no freezer durante 12 horas.
12. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (25°C).
13. Descartar o sobrenadante, adicionar 800 µL de etanol 70%. Misturar durante 1 minuto.
14. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (4°C).
15. Descartar o sobrenadante. Secar o pellet c/ papel absorvente. Adicionar 400 µL de TE (Tris EDTA). Deixar 1 hora na bancada e depois colocar na geladeira durante 12 horas.
16. Adicionar 4 µL de RNase a 10 ng/µL. Deixar a solução durante 2 horas à temperatura ambiente (25°C) e depois colocar na geladeira (4°C) durante 12 horas.
17. Adicionar 200 µL de fenol equilibrado e 200 µL de clorofórmio álcool isoamilico. Agitar durante 5 minutos.
18. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (25°C).
19. Transferir a fase aquosa para Tubo de Eppendorf.
20. Adicionar 400 µL de clorofórmio isoamilico e agitar 5 minutos.
21. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (25°C).
22. Transferir a fase aquosa para Tubo de Eppendorf.
23. Adicionar 250 µL de isopropanol e 25 µL de NaCl 5M. Misturar levemente por inversão durante 1 minuto (precipitado deve ser evidente). Colocar no freezer (-20°C)
24. Centrifugar 10.000 RPM por 5 minutos (25°C).
25. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 800 µL de etanol 70%. Misturar durante 1 minuto.

26. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos (25°C).
27. Descartar o sobrenadante, secar pellet e ressuspender em 50 µL de Tris EDTA.
28. Manter o DNA ressuspendido durante 3 horas (25°C).
29. Guardar as amostras em 4°C.

*Tampão de extração: PVP-40 (2,5%) + NaCl (0,5 M) + Tris HCl pH 7,0 (0,2 M) + EDTA (50 mM) + β-mercaptoetanol (1%) + sarcosil (3%) + etanol (20%) + H₂O MiliQ (q.s.p.)