

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

RAFAEL ROMERO MENDES

Padrões de resistência cruzada de picão-preto (*Bidens subalternans*) a inibidores da
ALS

MARINGÁ, 2018

RAFAEL ROMERO MENDES

PADRÕES DE RESISTÊNCIA CRUZADA DE PICÃO-PRETO (*Bidens subalternans*) A
INIBIDORES DA ALS

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Proteção de Plantas.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Constantin.

Maringá, 2018

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAEL ROMERO MENDES

Padrões de resistência cruzada de picão-preto (*Bidens subalternans*) a inibidores da
ALS

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 Examinadora composta pelos membros:

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

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

Prof. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dr. Fernando Storniolo Adegas
Embrapa Soja

Em: 19 de Fevereiro de 2018. Local: Anfiteatro NAPD, Bloco I-45, UEM – Campus Sede.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar o bem mais importante para qualquer ser humano, que seria indispensável para a realização deste trabalho: saúde.

À minha família por me acolher, me ensinar e me apoiar em todos os momentos, sejam eles felizes ou tristes. Meu pai: Antônio Devanir Mendes, minha mãe: Sandra Maria Catarino Silva Mendes e meu irmão: Gustavo Devanir Mendes.

À minha namorada Bárbara de Matos Marangoni pelo amor e carinho, por estar comigo em todos os momentos, participar das minhas conquistas e me apoiar nas atividades profissionais.

Aos professores e orientadores Rubem Silvério de Oliveira Jr. e Jamil Constantin pela amizade, pela paciência, ensinamentos, críticas, elogios, zelo e pela transfusão de conhecimento.

A todos os membros e ex membros da equipe NAPD/UEM, incluindo pesquisadores, mestrandos, doutorandos e graduandos, pois sem cada um deles este trabalho não seria possível.

Às professoras Claudete Aparecida Mangolin, Maria de Fátima Pires Silva Machado e Liriana Belizario Cantagalli pelos ensinamentos e orientações no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UEM.

A todos os meus amigos que torcem pela minha realização profissional.

A empresa Monsanto do Brasil LTDA, na pessoa dos pesquisadores Dr. Ramiro Fernando López-Ovejero e Dr. Gilmar José Picoli, pela amizade e disponibilização de materiais para a realização deste trabalho.

A CAPES, por financiar minha bolsa de estudos.

Ao NAPD/UEM por financiar meus materiais para os trabalhos desta dissertação.

Ao pesquisador da Embrapa Soja e ex orientador, Fernando Storniolo Adegas, pela orientação, conselhos e pela participação na banca examinadora.

EPÍGRAFE

*“... enquanto alguém faz guerra trazendo
fome e tristeza, minha luta é com a terra
pra não faltar pão na mesa...”*

Joel Marques.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
SUMMARY	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
CAPÍTULO 1. <i>SCREENING</i> DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS APLICADOS EM PRÉ E PÓS-EMERGÊNCIA EM POPULAÇÕES DE PICÃO-PRETO (<i>Bidens subalternans</i>) RESISTENTES	4
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2. IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES DE RESISTÊNCIA CRUZADA A INIBIDORES DA ALS EM PICÃO-PRETO (<i>Bidens subalternans</i>).....	24
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE PICÃO-PRETO (<i>Bidens subalternans</i>) COM DIFERENTES PADRÕES DE RESISTÊNCIA CRUZADA A INIBIDORES DA ALS	55
INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	74

CONCLUSÕES GERAIS	77
ANEXO I. RESUMO DE ANÁLISES DE VARIÂNCIA PARA OS EXPERIMENTOS DO CAPÍTULO 1	78
ANEXO II. QUADROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EXPERIMENTOS DO CAPÍTULO 2.	81
ANEXO III. QUADROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EXPERIMENTOS DO CAPÍTULO 3	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Herbicidas, doses, produtos comerciais e grupos químicos utilizados nos tratamentos dos experimentos em pré e pós emergência em <i>B. subalternans</i>	10
Tabela 2. Porcentagem de controle de quatro populações de <i>B. subalternans</i> a inibidores da ALS aplicados em pós-emergência.	12
Tabela 3. Porcentagem de massa seca em relação à testemunha de quatro populações de <i>B. subalternans</i> a inibidores da ALS aplicados em pós-emergência.	13
Tabela 4. Porcentagem de controle de quatro populações de <i>B. subalternans</i> a inibidores da ALS aplicados em pré-emergência.	15
Tabela 5. Porcentagem de massa seca em relação a testemunha de quatro populações de <i>B. subalternans</i> a inibidores da ALS aplicados em pré-emergência.	16
Tabela 6. Resumo dos níveis de controle aos 28 DAA em pré e pós-emergência para três populações de <i>Bidens subalternans</i> resistentes a inibidores da ALS.	19
Tabela 7. Informações das amostras de populações <i>Bidens</i> spp. coletadas para os experimentos. Maringá (PR), 2017.	30
Tabela 8. Parâmetros dos modelos, doses (g ha^{-1}) para 50% e 85% de eficácia dos herbicidas inibidores da ALS aplicados em três populações de <i>Bidens subalternans</i> resistentes.	35
Tabela 9. Fatores de resistência (FR) baseados no controle (DC_{50}) ou na massa em relação a testemunha (DM_{50}) em três populações de <i>Bidens subalternans</i> resistentes a inibidores da ALS.	37
Tabela 10. Controle de populações de <i>Bidens</i> spp. aos 28 DAA, classificadas quanto a resistência e padrões de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS.	41
Tabela 11. Número (n°) e frequência (%) de populações de <i>Bidens</i> spp. apresentando resistência ou sensibilidade a inibidores da ALS, atrazine e glyphosate no Brasil.	42
Tabela 12. Tratamentos e doses aplicados nos experimentos em duas populações de <i>Bidens subalternans</i> resistentes a inibidores da ALS.	63

Tabela 13. Níveis de controle (%) e massa seca da parte aérea em relação a testemunha (%) em três populações de <i>Bidens subalternans</i> resistentes a inibidores da ALS tratadas ou não com inibidores da P450 (malathion e butóxido de piperonila - PBO).	70
Tabela 14. Resumo da análise de variância e desdobramentos para o experimento em pós-emergência (Capítulo 1).	79
Tabela 15. Resumo da análise de variância e desdobramentos para o experimento em pré-emergência (Capítulo 1).	80
Tabela 16. Resumo da análise de variância e desdobramento para o experimento de dose resposta com o herbicida imazethapyr (Capítulo 2).	82
Tabela 17. Resumo da análise de variância e desdobramento para o experimento de dose resposta com o herbicida chlorimuron (Capítulo 2).	82
Tabela 18. Resumo da análise de variância e desdobramento para a variável porcentagem de controle para o experimento de dose resposta com o herbicida chlorimuron (Capítulo 2).	83
Tabela 19. Resumo da análise de variância para o experimento screening em várias populações com o herbicida imazethapyr (Capítulo 2).	84
Tabela 20. Resumo da análise de variância para o experimento screening em várias populações com o herbicida chlorimuron (Capítulo 2).	84
Tabela 21. Resumo da análise de variância para o experimento screening em várias populações com o herbicida diclosulam (Capítulo 2).	84
Tabela 22. Resumo da análise de variância para o experimento com inibidores da P450 e inibidores da ALS na população SUS (Capítulo 3).	86
Tabela 23. Resumo da análise de variância para o experimento com inibidores da P450 e inibidores da ALS na população R1 (Capítulo 3).	86
Tabela 24. Resumo da análise de variância para o experimento com inibidores da P450 e inibidores da ALS na população R2 (Capítulo 3).	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de dose-resposta em três populações de <i>B. subalternans</i> resistentes a inibidores da ALS. A e D) imazethapyr; B e E) chlorimuron; C e F) diclosulam.	36
Figura 2. Dispersão de populações de <i>Bidens</i> spp. resistentes a imazethapyr no Brasil e no estado do Paraná.	43
Figura 3. Dispersão de populações de <i>Bidens</i> spp. resistentes a chlorimuron no Brasil e no estado do Paraná.	45
Figura 4. Dispersão de populações de <i>Bidens</i> spp. resistentes a diclosulam no Brasil e no estado do Paraná.	47
Figura 5. Dispersão de populações de <i>Bidens</i> spp. com diferentes padrões de resistência cruzada a inibidores da ALS no Brasil.....	49
Figura 6. Esquema representativo do gene ALS (em preto) com as posições de aminoácidos onde já foram detectadas mutações para resistência a inibidores da ALS e regiões esperadas de amplificação (em azul) dos primers utilizados nas reações de PCR.	61
Figura 7. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene ALS de quatro populações de <i>B. subalternans</i> resistentes a inibidores da ALS.....	65
Figura 8. Eletroferograma do sequenciamento da região 1 do gene ALS de uma amostra da população Sus de <i>Bidens subalternans</i>	66

RESUMO GERAL

MENDES, R.R., Universidade Estadual de Maringá (UEM), Fevereiro de 2018, **Padrões de resistência cruzada de picão-preto (*Bidens subalternans*) a inibidores da ALS**. Orientador: Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Constantin.

Os herbicidas inibidores da ALS foram utilizados em larga escala na cultura da soja durante as décadas de 1980 e 1990. Estes herbicidas apresentam seletividade para diversas culturas ao redor do mundo, são utilizados em baixas doses e apresentam amplo espectro de controle em relação a outros mecanismos de ação. No entanto, existem algumas espécies de plantas daninhas que apresentam populações com resistência, as quais estão apresentando falhas de controle nas situações em que eles são utilizados. Duas espécies conhecidas como picão-preto (*Bidens subalternans* e *Bidens pilosa*) já apresentam populações resistentes há mais de 20 anos. No entanto, pouco se sabe como é a resposta das populações destas espécies aos herbicidas de diferentes grupos químicos dentre os inibidores da ALS. A proposta do presente trabalho foi de identificar e caracterizar os padrões de resistência cruzada em populações de picão-preto, bem como investigar o motivo pelo qual estes padrões ocorrem. Primeiramente, um “screening” com vários herbicidas de quatro grupos químicos (imidazolinonas, sulfonilureias, triazolopirimidinas, pirimidinil-benzoatos) foi realizado em três populações avaliadas previamente com aplicações em pré e pós-emergência. O segundo passo foi caracterizar os padrões por meio de curvas de dose resposta, além de avaliar mais populações de todo o Brasil para verificar se os padrões se repetiam para populações provavelmente de diferentes locais. Por fim, avaliou-se o mecanismo de resistência de duas populações. Os resultados demonstraram que pode haver resistência a diferentes herbicidas dentro de um grupo químico ou a diferentes grupos químicos de um mesmo mecanismo de ação. Ou seja, existem padrões diferentes dependendo da população avaliada. A resposta entre as modalidades (pré e pós-emergência) de aplicação é pouco evidente, demonstrando que existe resistência quando os herbicidas são aplicados nas duas modalidades. Três populações apresentaram diferentes padrões e diferenças no nível de resistência para os herbicidas imazethapyr (imidazolinonas), chlorimuron (sulfonilureas) e diclosulam (triazolopirimidinas). Não foram encontradas mutações em posições já conhecidas na sequência de aminoácidos do gene ALS por causar resistência. No entanto, existem evidências de que ocorre um aumento da atividade das enzimas P450 em duas populações, o que pode contribuir para a metabolização dos herbicidas.

Palavras-chave: Imidazolinonas. Sulfonilureias, Triazolopirimidinas. Imazethapyr. Chlorimuron. Diclosulam. Gene ALS. Citocromo P450 monooxigenases.

SUMMARY

MENDES, R.R. Maringá State University (UEM), February 2018, **Cross-resistance patterns to ALS inhibitors in beggarticks (*Bidens subalternans*)**. Advisor: Prof Dr. Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Co-advisor: Prof. Dr. Jamil constantin.

The ALS-inhibitors were used in the large scale in soybean fields due 80's and 90s. These herbicides are selective to several crops, are use in low doses and show broad spectrum than others mechanisms of actions. However, there are some species resistant to this mechanism of action, which are experiencing control failures when these herbicides are used. One of these species is beggarticks (*Bidens subalternans* e *B. pilosa*) those are resistant more than 20 years ago. The response in populations to herbicides across different chemical groups in ALS-inhibitors is unknow. The objective of this work was identify and characterize the cross-resistance patterns in beggarticks as well as investigated why these patterns occurs. Firstly, several herbicides from four chemical groups (imidazolinones, sulfonilureas, triazolopirimidines and pirimidinil-benzoate) were screening in three populations previously evaluated with pre and postemergence applications The second step was to characterize the patterns with dose-response experiments, besides to evaluating more populations across Brazilian fields to check if the patterns occurs in more than one local. In addiction the resistance mechanisms in two populations were evaluated. The results demonstrated that there may be resistance to different chemical group or to different herbicide across the sane chemical group, to one or more herbicides from same chemical group or not. There are different patterns depending on the evaluated population. The response between application modality (pre or postemergence) is barely evident demonstrating that there is resistance both. Three populatinos showed different patterns and different resistance levels for imazethapyr (imidazolinone), chlorimuron (sulfonilureia) and diclosulam (triazolopirimidine). No mutations were found in positions known to cause resistance in sequence of ALS gene. However, there are evidences that is an increase in P450 activity in two populatinos, which contributes to metabolism of herbicides.

Palavras-chave: Imidazolinonas. Sulfonilureias, Triazolopirimidines. Imazethapyr. Chlorimuron. Diclosulam. ALS gene. Cytochromo P450 monoxigenases.

INTRODUÇÃO GERAL

O controle químico de plantas daninhas na agricultura é o método mais utilizado por apresentar praticidade, flexibilidade na época de aplicação, rendimento e reduzido custo/benefício nas operações. Todavia, dentre outros problemas, a seleção de espécies de plantas daninhas resistentes têm sido uma das maiores desvantagens do uso indevido dos herbicidas.

A resistência ocorre por meio de um processo de seleção, em que indivíduos suscetíveis são eliminados, enquanto indivíduos resistentes, presentes em baixa frequência na população, se reproduzem e aumentam a sua frequência. Uma das primeiras plantas daninhas identificadas com resistência no Brasil foi o picão-preto (*Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*) resistente a inibidores da ALS. O gênero *Bidens* é originário do continente americano e encontra-se disseminado em diversas culturas, principalmente nas culturas anuais, como soja, milho, trigo e algodão.

Os inibidores da ALS são herbicidas que apresentam seletividade para uma gama de culturas, são eficazes em baixas doses e apresentam baixa toxicidade para mamíferos. Estes herbicidas são utilizados desde a década de 1980 no Brasil, sobretudo na cultura da soja, a qual representa hoje a principal exploração agrícola do país.

Mesmo com a adoção da tecnologia RR (Roundup Ready) em soja, milho e algodão, a qual permite a aplicação de glyphosate em pós emergência das culturas, os inibidores da ALS ainda apresentam-se como importantes herbicidas. Estes produtos podem ser utilizados para o controle de plantas daninhas em pré-emergência, assim como podem ser alternativas de controle de espécies resistentes ao glyphosate.

Em situações em que os inibidores da ALS são utilizados, muitos agricultores, agrônomos e pesquisadores têm identificado falhas no controle de picão-preto. Apesar da resistência a ALS ter sido relatada há mais de 20 anos para esta espécie, as populações presentes nas lavouras provavelmente ainda apresentam insensibilidade a estes herbicidas. Informações das características de resistência, tais como espectro, efeito da modalidade de aplicação, padrão de resistência cruzada, frequência e dispersão de populações e mecanismos de resistência podem auxiliar nas tomadas de decisões para o manejo destas espécies. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os padrões de resistência cruzada de picão-preto (*Bidens* spp.) a inibidores da ALS no Brasil.

**CAPÍTULO 1. *SCREENING* DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS
APLICADOS EM PRÉ E PÓS-EMERGÊNCIA EM POPULAÇÕES DE
PICÃO-PRETO (*Bidens subalternans*) RESISTENTES**

***Screening* de herbicidas inibidores da ALS aplicados em pré e pós-emergência em populações de picão-preto (*Bidens subalternans*) resistentes**

RESUMO – Populações de picão-preto resistentes a inibidores da ALS são encontradas em várias regiões do Brasil, no entanto a resposta a diferentes moléculas e/ou grupos químicos nem sempre é a mesma. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de três populações resistentes a diferentes herbicidas inibidores da ALS aplicados em pré e pós-emergência. Dezesesseis herbicidas foram aplicados com a dose recomendada e o dobro da dose em três populações resistentes e uma suscetível. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro aplicado em pós-emergência e o segundo aplicado em pré-emergência com as mesmas doses. As populações apresentaram resposta variável de controle para herbicidas de grupos químicos diferentes e para herbicidas de mesmo grupo químico. A resistência ocorre para três grupos químicos na população R1 (imidazolinonas – IMI's, sulfonilureas - SUL's e pirimidinil-benzoatos PIR's), para todos os grupos na população R2 e apenas para imazethapyr (IMI's) na população R3. A resistência a inibidores da ALS ocorre tanto em pós, como em pré-emergência.

Palavras-chave: Resistência cruzada. Imidazolinonas. Sulfonilureias. Triazolopirimidinas. Pirimidinil-benzoatos.

Herbicide screening of ALS-inhibitors applied in pre and postemergence in greater beggarticks (Bidens subalternans) resistant populations

ABSTRACT – Greater beggarticks populations resistant to ALS-inhibitors were found in several Brazilian regions, however the response to different molecules and/or chemical groups is not the same. The objective of this work was to evaluate the response of three resistant populations to different ALS-inhibitor herbicides applied in pre and postemergence. Sixteen herbicides were sprayed with label dose and double label dose in three resistant populations and one susceptible. Two experiments were realized, one in preemergence and other in postemergence with the same rates. The populations showed a varied response for herbicides of different chemical groups and for herbicides of the same chemical group. Resistance occurs for three chemical groups in the R1 population (imidazolinones - IMI's, sulfonylureas - SUL's and pyrimidinyl-benzoates PIRs), for all groups in the R2 population and only for imazethapyr (IMI's) in the R3 population. The ALS-resistance occurs both in pre and postemergence.

Keywords: Cross-resistance. Imidazolinones. Sulfonylureas. Triazolopyrimidines. Pyrimidinyl-benzoates.

INTRODUÇÃO

Casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas são cada vez mais frequentes no Brasil e no mundo. Até o momento, são 48 casos relatados no Brasil (HEAP, 2018). O primeiro registro de resistência ocorreu na década de 90, em plantas de *Bidens pilosa* encontradas com resistência aos herbicidas inibidores da ALS em lavouras de grãos (CHRISTOFFOLETI et al., 2002).

Desde então, o manejo de plantas daninhas sofreu modificações drásticas, principalmente com a consolidação do plantio direto e com o desenvolvimento de cultivares tolerantes à herbicidas. A comercialização de soja, milho e algodão tolerantes ao glyphosate fez com que o uso deste herbicida se intensificasse e uma das consequências foi a redução da preocupação com a resistência de plantas daninhas a outros herbicidas, como exemplo, os inibidores da ALS.

Entretanto, este é o grupo de herbicidas com maior número de relatos de resistência no Brasil e no mundo (HEAP, 2014). Com a resistência de algumas espécies ao glyphosate, a necessidade de se alternar mecanismos de ação e a comercialização de cultivares tolerantes a herbicidas, os inibidores da ALS tornam-se novamente importantes nos sistemas de produção (OSIPE et al., 2014).

Os inibidores da ALS possuem extrema relevância na agricultura por serem eficientes no controle de diversas espécies, por serem recomendados com baixas doses, por apresentarem baixa toxicidade para mamíferos e por serem seletivos para várias culturas. Dentro do mecanismo de ação, os inibidores da ALS são divididos em grupos químicos: imidazolinonas (IMI's); sulfonilureias (SUL's); triazolopirimidinas (TRI's) e pirimidinil-benzoatos (PIR's) (BECKIE e TARDIF, 2012; YU e POWLES, 2015). Grande parte dos relatos envolvem resistência cruzada, em que a população de plantas daninhas selecionada mediante a aplicação de herbicidas de um grupo químico, também não são controladas por herbicidas de outro grupo químico dentro do mesmo mecanismo de ação.

Um exemplo disto pode ser encontrado para as plantas daninhas do gênero *Bidens*. Popularmente conhecidas como picão-preto, o gênero engloba pelo menos duas importantes espécies infestantes em lavouras de grãos, *B. pilosa* e *B. subalternans*. Para o caso do picão-preto, já existem relatos de seleção de populações com resistência a inibidores da ALS de amplo espectro, ou seja, insensíveis a todos os grupos químicos (IMI's, SUL's, TRI's e PIR's) (LOPEZ-OVEJERO et al., 2006; LAMEGO et al., 2009).

Alguns produtos inibidores da ALS possuem ação em pré e pós-emergência, como por exemplo chlorimuron, metsulfuron, imazethapyr e diclosulam (OLIVEIRA NETO et al., 2010). A eficiência de herbicidas aplicados em pré-emergência pode ser influenciada pelas características do ambiente como pH do solo, volume de precipitações, atividade microbiana, volatilização e contato com as sementes e raízes (CARTER, 2000). Porém, em pós-emergência, aplicações em plantas em estádios mais avançados de desenvolvimento podem limitar a ação dos herbicidas em função da menor absorção ou translocação (MARQUES et al., 2012). Neste aspecto, é possível que uma população de planta daninha resistente apresente diferença na sensibilidade de acordo com a modalidade de aplicação. No caso de *B. pilosa*, já foi observado a resistência tanto em pré, quanto em pós emergência para todos os grupos químicos (GUERRA et al., 2011).

Levantadas as devidas questões, o objetivo deste trabalho foi avaliar os padrões de resistência cruzada em diferentes populações de *B. subalternans*, bem como a influência da modalidade de aplicação sobre a resposta aos inibidores da ALS.

MATERIAL E MÉTODOS

Antes do início dos experimentos, um total de 52 populações de picão-preto foram coletadas sementes em *bulk* (de cinco a dez plantas por talhão), armazenadas e identificadas em sacos de papel em temperatura ambiente. Estas populações receberam a aplicação de imazethapyr (106 g ha⁻¹) e diclosulam (30 g ha⁻¹) em pós-emergência (3-4 folhas). Três populações foram selecionadas, as quais apresentaram características diferentes de sensibilidade aos dois herbicidas. As populações denominadas R1 e R3 sobreviveram ao imazethapyr e foram sensíveis a diclosulam, enquanto a população R2 sobreviveu aos dois herbicidas.

Sementes das plantas parentais da população R2 foram coletadas em Balsas – MA (08°30'23''S; 46°44'59''O). A área de coleta pertence a uma propriedade produtora de soja convencional (não RR[®] – não tolerante a glyphosate) em sucessão com milho ou algodão safrinha. No talhão em que esta população foi coletada existe histórico de uso de inibidores da ALS como diclosulam e imazethapyr há pelo menos cinco anos na cultura da soja, assim como o uso de trifloxysulfuron e pyriithiobac-sodium na cultura do algodão. As parentais das populações R1 e R3 foram coletadas, pela ordem, em Assis Chateaubriand (24°17'23''S; 53°33'18''O) e Nova Aurora (24°34'29''S; 53°13'23''O), ambas no estado do PR. As plantas amostradas foram sobras do controle realizado em cada área. As propriedades realizam o cultivo de soja RR em sucessão com milho safrinha e não possuem histórico de uso de inibidores da ALS há pelo menos dez anos. A população considerada suscetível (SUS) foi coletada em área urbana no município de Maringá (PR), portanto, sem histórico de uso de herbicidas.

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação, no Centro Técnico de Irrigação da Universidade Estadual de Maringá, entre Novembro de 2016 e Março de 2017.

Foram conduzidos dois experimentos. Um deles foi realizado com a aplicação de vários inibidores da ALS em pós-emergência, aplicados em duas doses, correspondentes a uma e duas vezes a dose recomendada para o controle de *Bidens* spp. em pós-emergência (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011) (Tabela 1). O segundo experimento foi realizado com os mesmos tratamentos, no entanto, com a aplicação em pré-emergência. Todos os herbicidas utilizados apresentam registro em pelo menos uma espécie de *Bidens* spp. para uso em pré ou pós-emergência.

Tabela 1. Herbicidas, doses, produtos comerciais e grupos químicos utilizados nos tratamentos dos experimentos em pré e pós emergência em *B. subalternans*.

Tratamento	Vezes a dose	Dose (g de i.a. ha ⁻¹)	Produto comercial	Grupo químico
1 Imazethapyr	1 x	106,0	Vezir	IMI's
2 Imazethapyr	2 x	212,0		
3 Imazapic ^{1/}	1 x	122,5	Plateau	
4 Imazapic ^{1/}	2 x	245,0		
5 Chlorimuron-ethyl ^{1/}	1 x	20,0	Classic	SUL's
6 Chlorimuron-ethyl ^{1/}	2 x	40,0		
7 Metsulfuron ^{3/}	1 x	2,0	Wolf	
8 Metsulfuron ^{3/}	2 x	4,0		
9 Trifloxysulfuron-sodium ^{2/}	1 x	7,5	Envoke	TRI's
10 Trifloxysulfuron-sodium ^{2/}	2 x	15,0		
11 Cloransulam-methyl ^{2/}	1 x	30,0	Pacto	
12 Cloransulam-methyl ^{2/}	2 x	60,0		
13 Diclosulam ^{1/}	1 x	25,2	Spider 480 WG	
14 Diclosulam ^{1/}	2 x	50,4		
15 Pyriithiobac-sodium	1 x	42,0	Staple 240 SC	PIR's
16 Pyriithiobac-sodium	2 x	84,0		
17 Padrão ^{4/}	-	-	-	-
18 Testemunha sem aplicação	-	-	-	-

^{1/}Adicionado Assist (0,5% v v⁻¹); ^{2/}Adicionado Agral (0,2% v v⁻¹); ^{3/}Adicionado Assist (0,1% v v⁻¹); ^{4/}Pré-emergência: Sulfentrazone a 300 g ha⁻¹ (Boral 500 SC), pós-emergência: Lactofen a 180 g ha⁻¹ (Cobra). IMI's: imidazolinonas; SUL's: sulfonilureias; TRI's: triazolopirimidinas; PIR's: pirimidinil-benzoato.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos compuseram um esquema fatorial 19 x 4, sendo o primeiro fator correspondente a 17 tratamentos com herbicidas inibidores da ALS e um tratamento alternativo com herbicida de outro mecanismo de ação, mais uma testemunha sem aplicação. O segundo fator foi constituído pelas quatro populações de *B. subalternans* (SUS, R1, R2 e R3).

Para o ensaio em pré-emergência, vasos de 2,0 dm³ foram utilizados como parcelas. Foram semeadas 50 sementes à 0,5 cm de profundidade e os vasos foram irrigados com uma lâmina de 10 mm de água. As aplicações dos tratamentos com herbicidas foram realizados logo após. Para o experimento em pós-emergência, sementes foram semeadas em bandejas de 10 x 30 x 60 cm e as plântulas foram transplantadas para vasos de 10 dm³ (uma planta por vaso) quando estas apresentavam as folhas cotiledonares totalmente expandidas. As aplicações em pós-emergência foram realizadas quando as plantas apresentaram de 3 a 4 folhas.

As unidades experimentais foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação diária de 5 mm dia⁻¹. O solo utilizado nos dois ensaios era constituído por teor de argila de 21%, teor de areia de 68%, 2,1% de M.O., CTC de 9,8 mg dm⁻³, pH_{H2O} de 6,4 e foi preparado livre de torrões.

Para as aplicações, foi utilizado um equipamento pulverizador costal de pressão à base de CO₂, equipado com uma barra de pulverização de um metro com três pontas do tipo leque, modelo XR 110.02. O volume de calda utilizado foi de 200 L ha⁻¹. As aplicações foram feitas no período da manhã, com temperaturas abaixo de 30°C e umidade relativa do ar acima de 70%, livre de rajadas de vento.

Para os dois experimentos, foram avaliadas as porcentagens de controle na escala de 0-100% (zero significa a ausência de sintomas e 100% significa a morte da planta) aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA). Aos 28 DAA, a parte aérea das plantas presentes nos vasos foram cortadas e acondicionadas em estufa (72°C) para secagem e obtenção da matéria seca.

Os dados de todas as variáveis analisadas foram submetidos à análise do teste F e à comparação entre médias pelo teste de Scott-Knott (fator herbicidas) e t-student- LSD (fator populações), ambos à 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pós-emergência

No experimento em pós-emergência, houve interação significativa dos tratamentos herbicidas com as populações avaliadas. O desdobramento dos dados apresentou diferenças significativas entre populações e tratamentos herbicidas, tanto para a variável porcentagem de controle aos 28 DAA (Tabela 2), quanto para porcentagem de massa seca em relação à testemunha (Tabela 3).

Tabela 2. Porcentagem de controle de quatro populações de *B. subalternans* a inibidores da ALS aplicados em pós-emergência.

Tratamento (g ha ⁻¹)	% controle pós-emergência			
	SUS	R1	R2	R3
Imazethapyr (106)	91,8 <i>aA</i>	41,8 <i>dC</i>	7,5 <i>cD</i>	61,3 <i>bB</i>
Imazethapyr (212)	97,3 <i>aA</i>	37,5 <i>dC</i>	10,0 <i>cD</i>	60,0 <i>bB</i>
Imazapic (122,5)	100,0 <i>aA</i>	51,3 <i>cB</i>	1,3 <i>dC</i>	97,3 <i>aA</i>
Imazapic (245)	100,0 <i>aA</i>	95,0 <i>aA</i>	1,3 <i>dB</i>	98,8 <i>aA</i>
Chlorimuron (20)	100,0 <i>aA</i>	53,8 <i>cB</i>	46,3 <i>bB</i>	90,8 <i>aA</i>
Chlorimuron (40)	100,0 <i>aA</i>	64,3 <i>cB</i>	47,5 <i>bC</i>	92,8 <i>aA</i>
Trifloxysulfuron (7,5)	100,0 <i>aA</i>	57,5 <i>cB</i>	0,0 <i>dC</i>	91,3 <i>aA</i>
Trifloxysulfuron (15)	100,0 <i>aA</i>	61,8 <i>cB</i>	2,5 <i>dC</i>	97,0 <i>aA</i>
Metsulfuron (2)	100,0 <i>aA</i>	15,0 <i>eB</i>	3,8 <i>dC</i>	89,5 <i>aA</i>
Metsulfuron (4)	100,0 <i>aA</i>	51,3 <i>cB</i>	4,3 <i>dC</i>	98,8 <i>aA</i>
Cloransulam (30)	100,0 <i>aA</i>	84,3 <i>bB</i>	51,3 <i>bC</i>	89,8 <i>aAB</i>
Cloransulam (60)	100,0 <i>aA</i>	85,0 <i>bB</i>	53,0 <i>bC</i>	97,5 <i>aA</i>
Diclosulam (25,2)	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>	7,5 <i>cB</i>	97,5 <i>aA</i>
Diclosulam (50,4)	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>	17,5 <i>cB</i>	97,5 <i>aA</i>
Pyrithiobac (42)	95,0 <i>aA</i>	5,0 <i>fB</i>	0,0 <i>dB</i>	99,5 <i>aA</i>
Pyrithiobac (84)	95,0 <i>aA</i>	12,5 <i>eB</i>	0,0 <i>dC</i>	99,8 <i>aA</i>
Lactofen (180)	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>
Testemunha	0,0 <i>bA</i>	0,0 <i>fA</i>	0,0 <i>dA</i>	0,0 <i>cA</i>
F coluna	36,72	74,82	53,03	40,76
CV	12,07			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e de t-student (LSD) a 5% de probabilidade. DMS linha: 10,76.

Tabela 3. Porcentagem de massa seca em relação à testemunha de quatro populações de *B. subalternans* a inibidores da ALS aplicados em pós-emergência.

Tratamento (g ha ⁻¹)	% massa em relação a testemunha pós-emergência			
	Sus	R1	R2	R3
Imazethapyr (106)	11,8 <i>bB</i>	64,3 <i>bA</i>	94,4 <i>aA</i>	65,9 <i>bA</i>
Imazethapyr (212)	6,8 <i>bB</i>	51,9 <i>bA</i>	67,2 <i>aA</i>	44,0 <i>bAB</i>
Imazapic (122,5)	6,5 <i>bC</i>	46,4 <i>bB</i>	112,1 <i>aA</i>	14,0 <i>cBC</i>
Imazapic (245)	0,0 <i>bB</i>	4,7 <i>cB</i>	106,8 <i>aA</i>	0,1 <i>cB</i>
Chlorimuron (20)	0,0 <i>bB</i>	58,0 <i>bA</i>	41,3 <i>bA</i>	24,9 <i>cAB</i>
Chlorimuron (40)	0,0 <i>bB</i>	12,9 <i>cAB</i>	44,0 <i>bA</i>	0,4 <i>cB</i>
Trifloxysulfuron (7,5)	0,0 <i>bC</i>	46,4 <i>bB</i>	93,3 <i>aA</i>	14,4 <i>cBC</i>
Trifloxysulfuron (15)	3,4 <i>bB</i>	23,2 <i>cB</i>	79,5 <i>aA</i>	8,8 <i>cB</i>
Metsulfuron (2)	0,0 <i>bB</i>	91,2 <i>aA</i>	77,5 <i>aA</i>	36,5 <i>cB</i>
Metsulfuron (4)	0,0 <i>bC</i>	41,7 <i>bB</i>	81,4 <i>aA</i>	5,6 <i>cBC</i>
Cloransulan (30)	0,0 <i>bA</i>	17,2 <i>cA</i>	35,0 <i>bA</i>	21,1 <i>cA</i>
Cloransulam (60)	0,0 <i>bA</i>	14,7 <i>cA</i>	24,0 <i>bA</i>	0,0 <i>cA</i>
Diclosulam (25,2)	0,0 <i>bB</i>	1,8 <i>cB</i>	70,7 <i>aA</i>	9,0 <i>cB</i>
Diclosulam (50,4)	0,0 <i>bB</i>	0,0 <i>cB</i>	50,5 <i>bA</i>	0,0 <i>cB</i>
Pyriithiobac (42)	3,4 <i>bB</i>	90,6 <i>aA</i>	122,6 <i>aA</i>	12,8 <i>cB</i>
Pyriithiobac (84)	17,8 <i>bBC</i>	47,5 <i>bB</i>	102,0 <i>aA</i>	4,3 <i>cC</i>
Lactofen (180)	0,0 <i>bA</i>	0,0 <i>cA</i>	0,0 <i>cA</i>	0,0 <i>cA</i>
Testemunha	100,0 <i>aB</i>	100,0 <i>aB</i>	100,0 <i>aB</i>	100,0 <i>aB</i>
F coluna	2,76	5,35	5,72	3,61
CV	80,28			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e de t-student (LSD) a 5% de probabilidade. DMS linha: 39,25.

A população suscetível foi sensível a todos os herbicidas avaliados, apresentando níveis de controle acima de 91%, que se assemelham ao tratamento padrão (lactofen 240 g i.a. ha⁻¹).

Para a população R1, níveis de controle aceitáveis (>80%) foram verificados apenas com a aplicação de herbicidas do grupo das TRI's (cloransulam e diclosulam). Não foram observadas diferenças nítidas entre os grupos químicos IMI's e SUL's, os quais, de forma geral, resultaram em níveis intermediários de injúrias. O aumento da dose de imazapic resultou em controle excelente, o que não foi observado para imazethapyr, indicando que pode haver diferenças nos níveis de resistência entre herbicidas do mesmo grupo químico. Para as SUL's, o tratamento que inferior foi metsulfuron na dose 1x, o qual proporcionou controle mais baixo do que as demais SUL's. Ao avaliar o resultado de controle proporcionado pelo pyriithiobac-sodium (PIR's), observou-se controle muito baixo desta população.

A população R2 foi a mais resistente e o controle máximo obtido pelos inibidores da ALS foi de 53%. Os herbicidas dos grupos das IMI's (imazethapyr e imazapic) e TRI's (pyriithiobac-sodium) praticamente não afetaram o crescimento das plantas, visto que as

porcentagens de massa seca foram semelhantes ou mais altas em relação à testemunha nestes tratamentos (Tabela 3). Nesta população, apesar dos níveis de controle muito baixos, também foi possível observar diferença na resposta a herbicidas do mesmo grupo. O chlorimuron resultou em controle acima de 46%, enquanto os outros herbicidas SUL's proporcionaram controle abaixo de 4%. O cloransulam também teve desempenho intermediário, acima de 50%, enquanto o diclosulam, outro herbicida do grupo das TRI's, apresentou controle abaixo de 18%.

Ao avaliar a população R3, os dados de controle porcentual e massa seca foram muito semelhantes à população SUS. Isto indica que a maioria dos tratamentos foram letais nas doses avaliadas. Mesmo para o pirithiobac-sodium (PIR's), herbicida para o qual as demais populações (R1 e R2) não apresentaram controle significativo, foi eficaz no controle da R3.

O único herbicida que não resultou em níveis satisfatórios de controle da R3 foi o imazethapyr, que resultou em desempenho inferior ao observado na população SUS. Portanto, os resultados obtidos com esta população demonstram que a resistência pode ser específica a um único herbicida dentro de um único grupo químico.

Diferentemente do que foi observado no presente trabalho, biótipos de caruru (*Amaranthus retroflexus*) do Mato Grosso do Sul podem ser resistentes a trifloxysulfuron mas suscetíveis a pirithiobac-sodium (FRANCISCHINI et al., 2018). Ao avaliar o herbicida trifloxysulfuron em *B. pilosa* resistente a inibidores da ALS, Braz et al. (2011) observaram controle nulo, mesmo quando aplicado associado ao pirithiobac-sodium. Esta resposta se assemelha ao que foi verificado na população R2, na qual estes herbicidas promoveram controle de apenas 2,5%.

Em um biótipo de *B. pilosa* resistente já foram observadas porcentagens de controle superiores com chlorimuron e cloransulam em relação aos demais inibidores da ALS, como imazetapyr, imazaquin, diclosulam e pirithiobac-sodium (GUERRA et al., 2011). Este tipo de resistência cruzada também é semelhante à observada na população R2.

Em experimentos de curvas de dose-resposta já foram relatadas populações de *B. pilosa* e *B. subalternans* com maiores níveis de resistência a imazethapyr do que a chlorimuron (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006) o que se assemelha ao padrão observado nas populações R1 e R3.

Pré-emergência

No experimento em pré-emergência os fatores população e tratamentos herbicidas apresentaram interação significativa (p -valor $< 0,05$). Os desdobramentos resultaram em diferenças, tanto entre populações, quanto entre tratamentos herbicidas nas variáveis resposta analisadas.

Todos os herbicidas apresentaram controle satisfatório da população SUS, resultando em redução da massa seca em pelo menos 75%.

Na população R1, os herbicidas que tiveram melhor desempenho foram os do grupo das TRI's, assim como no experimento em pós-emergência. Imazapic e trifloxysulfuron também resultaram em razoáveis níveis de controle (acima de 70%), juntamente com a dose 2x do metsulfuron, o que não foi verificado no experimento em pós-emergência (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de controle de quatro populações de *B. subalternans* a inibidores da ALS aplicados em pré-emergência.

Tratamento (g ha ⁻¹)	% controle pré-emergência			
	Sus	R1	R2	R3
Imazethapyr (106)	52,5 cA	24,8 cB	21,3 cB	65,0 eA
Imazethapyr (212)	87,0 bA	25,0 cC	6,3 dD	67,0 eB
Imazapic (122,5)	95,5 aA	72,5 bB	27,5 cC	76,8 dB
Imazapic (245)	97,0 aA	97,0 aA	50,0 bB	87,0 bA
Chlorimuron (20)	88,3 aA	0,0 dB	12,5 dB	80,5 cA
Chlorimuron (40)	98,5 aA	18,8 cC	60,0 bB	87,3 bA
Trifloxysulfuron (7,5)	99,3 aA	77,5 bB	6,3 dC	81,3 cB
Trifloxysulfuron (15)	100,0 aA	82,0 bB	10,0 dC	91,3 aAB
Metsulfuron (2)	95,0 aA	23,8 cB	30,0 cB	85,5 bA
Metsulfuron (4)	94,3 aA	41,3 cB	57,5 bB	92,5 aA
Cloransulan (30)	96,0 aA	78,8 bB	12,5 dC	85,0 cAB
Cloransulam (60)	97,5 aA	89,8 aA	29,8 cB	96,8 aA
Diclosulam (25,2)	98,5 aA	97,8 aA	16,3 dB	93,0 aA
Diclosulam (50,4)	95,8 aA	99,0 aA	36,3 cB	93,3 aA
Pyrithiobac (42)	89,8 aA	10,0 dC	10,0 dC	62,5 eB
Pyrithiobac (84)	92,3 aA	7,5 dC	13,8 dC	61,3 eB
Sulfentrazone (300)	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Testemunha	0,0 dA	0,0 dA	0,0 aA	0,0 fA
F coluna	15,53	41,84	17,82	14,61
CV			19,62	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e de t-student (LSD) a 5% de probabilidade. DMS linha: 16,64.

De forma semelhante ao que foi observado em pós-emergência, a população R2 foi aquela que apresentou maior nível de tolerância aos herbicidas dentre todas as populações para as aplicações em pré-emergência. Apenas as doses 2x de imazapic, chlorimuron e metsulfuron apresentaram controle acima de 50%, o que não havia sido constatado no experimento em pós-emergência. O cloransulam apresentou desempenho inferior ao observado em pós-emergência, resultando em níveis abaixo de 30%.

Injúrias com valores intermediários (entre 60 e 67%) foram constatadas na população R3 apenas para imazethapyr, semelhante ao que foi verificado em pós-emergência, e também para o pyriithiobac-sodium. Os demais tratamentos resultaram em reduções de massa seca semelhantes às observadas na população SUS (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de massa seca em relação a testemunha de quatro populações de *B. subalternans* a inibidores da ALS aplicados em pré-emergência.

Tratamento (g ha ⁻¹)	% massa em relação a testemunha pré-emergência			
	Sus	R1	R2	R3
Imazethapyr (106)	25,1 <i>bA</i>	71,6 <i>bA</i>	42,3 <i>bA</i>	12,3 <i>bA</i>
Imazethapyr (212)	12,1 <i>bB</i>	76,7 <i>bA</i>	109,5 <i>aA</i>	4,1 <i>bB</i>
Imazapic (122,5)	2,9 <i>bB</i>	13,9 <i>cB</i>	75,8 <i>aA</i>	18,2 <i>bB</i>
Imazapic (245)	0,0 <i>bB</i>	1,1 <i>cB</i>	90,5 <i>aA</i>	16,6 <i>bB</i>
Chlorimuron (20)	7,1 <i>bC</i>	172,0 <i>aA</i>	76,9 <i>aB</i>	3,1 <i>bC</i>
Chlorimuron (40)	1,2 <i>bB</i>	99,5 <i>bA</i>	38,5 <i>bB</i>	1,2 <i>bB</i>
Trifloxysulfuron (7,5)	0,0 <i>bB</i>	14,0 <i>cB</i>	118,3 <i>aA</i>	1,4 <i>bB</i>
Trifloxysulfuron (15)	0,0 <i>bB</i>	13,4 <i>cB</i>	89,6 <i>aA</i>	0,2 <i>bB</i>
Metsulfuron (2)	3,5 <i>bB</i>	46,9 <i>cAB</i>	91,5 <i>aA</i>	14,2 <i>bB</i>
Metsulfuron (4)	3,7 <i>bA</i>	51,2 <i>cA</i>	38,3 <i>bA</i>	0,2 <i>bA</i>
Cloransulan (30)	2,7 <i>bB</i>	27,8 <i>cB</i>	96,2 <i>aA</i>	21,2 <i>bB</i>
Cloransulam (60)	1,4 <i>bB</i>	15,8 <i>cB</i>	96,3 <i>aA</i>	0,0 <i>bB</i>
Diclosulam (25,2)	0,3 <i>bB</i>	4,0 <i>cB</i>	164,2 <i>aA</i>	0,3 <i>bB</i>
Diclosulam (50,4)	4,6 <i>bB</i>	0,0 <i>cB</i>	135,5 <i>aA</i>	0,1 <i>bB</i>
Pyriithiobac (42)	8,5 <i>bB</i>	105,0 <i>bA</i>	133,2 <i>aA</i>	13,4 <i>bB</i>
Pyriithiobac (84)	4,4 <i>bB</i>	139,8 <i>aA</i>	161,2 <i>aA</i>	14,1 <i>bB</i>
Sulfentrazone (300)	0,0 <i>aA</i>	0,0 <i>dA</i>	0,0 <i>bA</i>	0,0 <i>bA</i>
Testemunha	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>	100,0 <i>aA</i>
F coluna	1,55	8,1	5,48	1,56
CV	88,28			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e de t-student (LSD) a 5% de probabilidade. DMS linha: 51,53.

O imazethayr e pyriithiobac foram os herbicidas com menor atividade em pré-emergência sobre todas as populações, diferentemente do que foi constatado por Guerra et al. (2011). Neste trabalho, um dos únicos inibidores da ALS que resultou em fitointoxicação de *B. pilosa* resistente a inibidores da ALS foi o pyriithiobac. O aumento da dose dos herbicidas (de 1x para 2x) resultou em aumento nos níveis de injúria nas populações R1, R2 e R3 para vários dos herbicidas avaliados, principalmente nos casos em que o controle porcentual é moderado (controle entre 30 a 60%). Isto não havia sido constatado no experimento em pós-emergência.

Em biótipos de caruru (*Amaranthus retroflexus*) resistentes a trifloxysulfuron e pyriithiobac-sodium, observou-se elevados fatores de resistência tanto em aplicações em pré, quanto em pós-emergência (FRANCISCHINI et al., 2018).

A massa seca de estruturas reprodutivas como sementes e aquênios (pré-emergência) é menor em relação à massa seca de plantas com 3-4 folhas (pós-emergência), o que sugere que sejam necessárias doses maiores em pós do que em pré para verificar a mesma fitointoxicação em espécies resistentes. No entanto, os mecanismos de resistência de cada população são tão importantes quanto as características dos herbicidas, para que ocorra diferentes níveis de resistência.

Os mecanismos denominados *target-site-resistance* ocorrem quando a ligação sítio-herbicida é afetada. Isto acontece porque as plantas selecionadas possuem mutações no gene que codifica a proteína alvo da molécula (POWLES e YU, 2010). As mutações alteram a conformação estrutural do sítio e o herbicida fica incapaz de se ligar e promover a intoxicação. Nestes casos, mesmo doses elevadas podem ser insuficientes para promover a ação do herbicida. Portanto, mesmo em pré-emergência, quando assume-se que a relação dose/massa seca de plantas é alta, a sobrevivência das plantas resistentes pode acontecer.

Em casos de mecanismos *non-target-site*, existe alguma capacidade dos biótipos resistentes em tornar a molécula não tóxica. Um exemplo encontrado em diversas plantas daninhas é o aumento da metabolização do herbicidas por enzimas como a P540 monoxigenases e a glutathione-S-transferase (YASUOR et al., 2009; DÉLYE et al., 2012; SONG et al., 2017). Nestes casos, a molécula herbicida é transformada em outros metabólitos por essas enzimas, portanto, a quantidade de ingrediente ativo que chega ao sítio de ação é menor. Em plantas capazes de metabolizar os herbicidas, doses elevadas podem causar injúrias porque parte do herbicida absorvido ainda pode se ligar ao sítio de ação. Por isso, a aplicação em pré-emergência pode ocasionar injúrias severas pois as plântulas absorvem mais herbicida do que sua capacidade máxima em metabolizá-los.

Em caruru (*Amaranthus tuberculatus*) resistente a atrazine, Ma et al. (2016) observaram resistência em pré e em pós para uma população, e apenas resistência em pós para outra população. Os autores afirmam que a população resistente apenas em aplicações em pós-emergência tem como um dos mecanismos a metabolização do herbicida, enquanto a população resistente nas duas modalidades de aplicação apresentam um mecanismo *target-site*.

Outro mecanismo *non-target-site* conhecido é a absorção ou translocação diferencial (CRUZ et al., 2016; GHANIZADEH et al., 2016). Se o mecanismo de resistência for causado pela capacidade de um biótipo em absorver ou translocar menos herbicida, a fitointoxicação seria evidentemente maior quando a molécula em questão for aplicada em pré-emergência.

Diferentes mutações no gene ALS (*target-site-resistance*) podem existir, proporcionando padrões de resistência cruzada variados, como já verificado em *Conyza canadensis* (ZHENG et al., 2011), *Cyperus iria* (RIAR et al., 2015) e *Amaranthus palmeri* (NAKKA et al., 2017). Além disso, a metabolização de inibidores da ALS também já foi relatada conferindo resistência a um ou mais herbicidas em *Echinochloa crus-galli* (MATTEI e MEROTTO JR., 2016) e *Bromus rigidum* (OWEN et al., 2012). É possível que as diferenças observadas entre as populações sejam consequência do mecanismo de resistência de cada uma.

O resumo dos níveis de controle de cada população, tanto em pré, como em pós-emergência encontram-se na Tabela 6. Observa-se que a população R2 foi a mais resistente, seguida da população R1 e R3. A comparação entre modalidades de aplicação apresentou poucas diferenças, as quais foram específicas para cada população. A resistência observada em ambas as modalidades de aplicação pode significar que os mecanismos de resistência fazem com que as plantas tolerem altas doses, o que pode indicar mecanismos de *target-site resistance*. Por outro lado, pode haver mais de um mecanismo de resistência em uma população, por exemplo, maior capacidade de metabolização somado a mutações no gene ALS, ou ainda, mais de um mecanismo *non-target site*.

Tabela 6. Resumo dos níveis de controle aos 28 DAA em pré e pós-emergência para três populações de *Bidens subalternans* resistentes a inibidores da ALS.

Herbicida	Dose (g ha ⁻¹)	SUS		R1		R2		R3	
		PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
Imazethapyr	106,0	Amarelo	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde
Imazethapyr	212,0	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde
Imazapic	122,5	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde
Imazapic	245,0	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Vermelho	Verde	Verde
Chlorimuron	20,0	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Verde	Verde
Chlorimuron	40,0	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde
Trifloxysulfuron	7,5	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde
Trifloxysulfuron	15,0	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde
Metsulfuron	2,0	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde
Metsulfuron	4,0	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Verde	Verde
Cloransulan	30,0	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Verde	Verde
Cloransulam	60,0	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Verde	Verde
Diclosulam	25,2	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde
Diclosulam	50,4	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde
Pyrithiobac	42,0	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde
Pyrithiobac	84,0	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde
Padrão	-	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

Vermelho: controle <30%; amarelo: controle entre 30 e 80%; verde: controle acima de 80%. R1: população resistente 1; R2: população resistente 2, R3: população resistente 3. ¹pré-emergência: sulfentrazone (300 g ha⁻¹), pós-emergência: lactofên (180 g ha⁻¹).

CONCLUSÕES

No presente trabalho, a ordem de sensibilidade para as populações aos inibidores da ALS foi $SUS > R3 > R1 > R2$, tanto em pós, como em pré-emergência.

Cada população avaliada apresentou particularidades quanto à resistência aos inibidores da ALS, pois o nível de resistência cruzada variou entre herbicidas de um mesmo grupo químico e entre grupos diferentes. Para R1, os melhores níveis de controle foram para diclosulam e cloransulam. Para R2 os maiores resultados foram com os herbicidas chlorimuron e cloransulam e para a população R3 houve resultados insatisfatórios apenas para imazethapyr. Não foram observadas diferenças nítidas entre as aplicações em pré e pós emergência.

REFERÊNCIAS

- BECKIE, H.J.; TARDIF, F.J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v.35, n.1, p.15-28, 2012.
- BRAZ, G.B.P.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; DAN, H.A.; OLIVEIRA NETO, A.M.; SANTOS, G.; FRANCISCHINI, A.C.; TAKANO, H.K. Herbicidas alternativos no controle de *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla* resistentes a inibidores de ALS na cultura do algodão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, n.2, p.74-85, 2011.
- CARTER, A.D. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. **Weed Research**, v.40, n.1, p.113-122, 2000.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.513-518, 2002.
- CRUZ, R.A.; FERNÁNDEZ-MOREO, P.; OZUNA, C.V.; ROJANO-DELGADO, A.M.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; DOMINGUEZ-VELEZUELA, J.A.; BARRO, F.; PRADO, R. Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1, p.1-12, 2016.
- DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v.69, n.2, p.176-187, 2012.
- FRANCISCHINI, A.C.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR., R.S. TAKANO, H.K.; MENDES, R.R. Multiple and cross-resistance to *Amaranthus retroflexus* to ALS-inhibitors and photosystem II applied in preemergence. **Planta Daninha**, no-prelo, 2018.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.C.; JAMES, T.K.; WOOLLEY, D.J.; ELLISON, N.W. Restricted herbicide translocation was found in two glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations from New Zealand. **Journal of Agriculture and Science Technology**, v.18, n.4, 1041-1051.
- GUERRA, N.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA NETO, A.M.; DAN, H.A.; ALONSO, D.G.; SANTOS, G.; JUMES, T.M.C. Efeito da modalidade de aplicação sobre o controle de *Bidens pilosa* resistente a herbicidas inibidores da enzima ALS. **Global Science and Technology**, v.4, n.1, p.61-69, 2011.
- HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, v.70, n.9, p.1306-1315, 2014.
- HEAP, I. The international Survey of Herbicide Resistant Weeds. ALS mutation data base. Disponível em: <http://weedsociety.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>, acesso em 07 jan. 2018.
- LAMEGO, F.P.; CHARLSON, D.; DELATORRE, C.A.; BURGOS, N.R.; VIDAL, A.R. Molecular basis of resistance to ALS-inhibitor herbicides in Greater beggarticks. **Weed Science**, v.57, n.1, p.474-481, 2009.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; ABREU, A.G.; GROMBONE-GUARATINI, M.T.; TOLEDO, R.E.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistance and differential susceptibility of *Bidens pilosa* and *B. subalternans* biotypes to ALS-inhibiting herbicides. **Scientia Agricola**, v.63, n.2, p.139-145, 2006.

MA, R.; EVANS, A.F.; RIECHERS, D.E. Differential responses to preemergence and postemergence atrazine in two atrazine-resistant waterhemp populations. **Agronomy Journal**, v.108, n.3, p.1196-1202, 2016.

MARQUES, R.P.; RODELLA, R.A.; MARTINS, D. Características da anatomia foliar de espécies de braquiária e sua relação com a sensibilidade a herbicidas. **Planta Daninha**, v.30 n.4, p.809-816, 2012.

MATTEI, M.D.; MEROTTO JR., A. Efeito da concentração de CO₂ sobre o controle de capim-arroz resistentes ao imazethapyr e expressão de genes relacionados a detoxificação. 2016. **Resumos**. In.: XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Porto Alegre, 2016.

NAKKA, S.; THOMPSON, C.R.; PETERSON, D.E.; JUGULAM, M. Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, v.65, n.6, p.681-689, 2017.

OLIVEIRA NETO, A.M.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR., R.S.; GUERRA, N.; DAN, H.A.; ALONSO, D.G.; BLAINSKI, E.; SANTOS, G. Estratégias de manejo de inverno e verão visando ao controle de *Conyza bonariensis* e *Bidens pilosa*. **Planta Daninha**, v.28, n.3, p.1107-1116, 2010.

OSIPE, J.B.; OLIVEIRA JR., R.S.; FRANCHINI, L.H.M.; GHENO, E.A.; RAIMONDI, M.A. Seletividade de aplicações combinadas de herbicidas em pré e pós-emergência para a soja tolerante ao glyphosate. **Bioscience Journal**, v.30, n.3, p.623-631, 2014.

OWEN, M.J.; GOGGIN, D.E.; POWLES, S.B. Non-target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in six *Bromus rigidus* populations from Western Australian cropping fields. **Pest Management Science**, v.98, n.7, p.1077-1082, 2012.

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

RIAR, D.S.; TEHRANCHIAN, P.; NORSWORTHY, J.K.; NANDULA, V.; MCELORY, S.; SIVASTAVA, V.; CHEN, S.; BOND, J.A.; SCOTT, R.C. Acetolactate synthase-inhibiting, herbicide-resistant rice flatsedge (*Cyperus iria*): cross-resistance and molecular mechanism of resistance. **Weed Science**, v.63, n.4, p.748-757, 2015.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: 2011. 648 p.

SONG, J.; LIM, S.; YOON, M.; KIM, J.; KIM, J. Cross-resistance of *Echinochloa* species to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Weed Biology and Management**, v.17, n.2, p.91-102, 2017.

YASUOR, H.; OSUNA, M.D.; ORTIZ, A.; SALDAN, N.E.; ECKERT, J.W.; FICHER, A.J. Mechanism of resistance to penoxulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3653-3660, 2009.

YU, Q.; POWLES, S.B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p.1340-1350, 2015.

ZHENG, D.; KRUGER, G.R.; SINGH, S.; DAVIS, V.M.; TRANEL, P.J.; WELLER, S.C.; JOHNSON, W.G. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest Management Science**, v.67, n.2, p.1486-1492, 2011.

**CAPÍTULO 2. IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES DE RESISTÊNCIA
CRUZADA A INIBIDORES DA ALS EM PICÃO-PRETO (*Bidens*
spp.)**

Identificação de padrões de resistência cruzada a inibidores da ALS em picão-preto (*Bidens* spp.)

RESUMO - Populações de picão-preto (*Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*) apresentam resistência aos herbicidas inibidores da ALS desde a década de 1990 no Brasil. O objetivo deste trabalho foi de investigar se existem padrões de resistência cruzada diferentes entre os herbicidas inibidores da ALS em populações de *Bidens* spp. Experimentos de dose-resposta foram realizados com os herbicidas imazethapyr, chlorimuron e diclosulam em três populações resistentes. Outras populações coletadas no estado do Paraná e em outros estados do Brasil foram avaliadas quanto à sensibilidade aos três herbicidas para verificar se os padrões ocorrem em outras regiões. Os experimentos de dose-resposta revelaram resistência cruzada com características diferentes. Uma das populações (R2) foi resistente aos três herbicidas. Outra população foi resistente a imazethapyr e chlorimuron, mas não a diclosulam (R1) e a terceira população apresentou resistência apenas a imazethapyr (R3). Os resultados demonstraram que existem padrões diferentes de resistência cruzada, pois estes se repetem em outras populações de *Bidens* spp., porém sem que houvesse relação entre os padrões observados e a localização geográfica das amostras.

Palavras-chave: Imazethapyr. Chlorimuron. Diclosulam.

Identification of cross-resistance patterns to ALS-inhibitors in greater beggarticks (Bidens spp.)

ABSTRACT – Greater beggarticks (*Bidens pilosa* and *Bidens subalternans*) populations are resistant to ALS-inhibitors since 1990's decade. The objective of this work was investigate if there are different cross-resistance patterns between ALS-inhibitors herbicides in *Bidens* spp. populations. Dose-response experiments were realized with imazethapyr, chlorimuron and diclosulam in three populations. Sensibility to others populations from the Paraná State and Brazilian regions also were avaluated. The dose-response assay revealed cross-resistance with different patterns. One population was resistant all three herbicides. A second population was resistant to imazethapyr and chlorimuron, but not to diclosulam and a third population was resistant only to imazethapyr. The results showed that there are different cross-resistance patterns because were also found in other *Bidens* spp. populations, however dispersed and mixed in regions sampled.

Keywords: Imazethapyr. Chlorimuron. Diclosulam.

INTRODUÇÃO

Plantas daninhas do gênero *Bidens* são espécies da família Asteraceae, originárias da América do Sul e podem ser encontradas em todo o território brasileiro, principalmente nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul. As plantas se reproduzem exclusivamente por sementes e podem medir até 120 cm de altura. São espécies que podem ser encontradas infestando a maior parte das culturas anuais, principalmente a soja, milho, trigo e algodão (KISSMANN e GROTH, 1999; LORENZI, 2014).

As principais espécies de plantas daninhas conhecidas dentro do gênero *Bidens* são *B. pilosa* e *B. subalternans*. São espécies muito semelhantes morfológicamente e por isso, o reconhecimento no campo tem sido desafiador para agricultores, técnicos e pesquisadores (GROMBONE-GUARATINI et al., 2004). As principais diferenças entre as duas espécies estão na estrutura dos aquênios e na ramificação. *B. pilosa* apresentam 2-3 aristas em seus aquênios enquanto os aquênios de *B. subalternans* apresentam de 3-4 aristas. No terço superior das plantas, a ramificação é dicotômica em *B. pilosa* ao passo que em *B. subalternans* a ramificação é alternada (GROMBONE-GUARATINI et al., 2004; KISSMANN e GROTH, 1999).

Populações de ambas as espécies já foram constatadas como resistentes a herbicidas. *B. pilosa* foi a primeira espécie de planta daninha relatada como resistente no Brasil, apresentando resistência cruzada a inibidores da ALS na década de 1990 (CHRISTOFOLETTI et al., 2002). Mais adiante, *B. subalternans* também foi relatada com este tipo de resistência (GELMINI et al., 2002). Para ambas espécies, algumas populações já apresentam resistência múltipla a inibidores da ALS e a inibidores do Fotossistema II em áreas de produção de grãos no Brasil (GAZZIERO et al., 2008; TAKANO et al., 2016). Recentemente, no México, uma população de *B. pilosa* foi encontrada apresentando resistência ao glyphosate (CRUZ et al., 2016).

Para inibidores da ALS, populações das duas espécies apresentam elevados fatores de resistência. A razão entre a dose para o controle de 50% de populações resistentes e a dose para o controle de 50% de populações suscetíveis (Fator de Resistência - FR) ultrapassa 20 vezes (MONQUERO et al., 2000; TAKANO et al., 2016). As populações avaliadas também já foram constatadas com resistência cruzada a diferentes herbicidas inibidores da ALS (LAMEGO et al., 2009). Pode haver ainda, suscetibilidade diferenciada entre *B. pilosa* e *B. subalternans* resistentes (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006). Portanto, não há ainda, estudos que indicam qual é ou quais são os principais padrões de resistência a ALS em *Bidens* spp.

Os inibidores da ALS são compostos por quatro grupos químicos de herbicidas: imidazolinonas (IMI's), sulfonilureias (SUL's), triazolopirimidinas (TRI's), pirimiditio-

benzoatos (PIR's). Estes herbicidas inibem a primeira enzima que participa do processo de formação de aminoácidos essenciais das plantas, como valina, leucina e isoleucina. A reação catalisada pela ALS envolve a descarboxilação de uma molécula de piruvato, produzindo uma enzima intermediária de hidroxila que reage com uma segunda molécula de piruvato ou 2-cetobutirato para produzir (S)-2-cetobutirato ou (S)-2-aceto-2-hidroxibutirato, respectivamente (GARCIA et al., 2017).

Em espécies de plantas daninhas resistentes pode haver diferentes padrões de resistência cruzada entre os grupos químicos. Isto significa que pode haver resistência a um único herbicida, a um grupo químico ou a dois ou mais grupos (DENG et al., 2014). Geralmente, os mecanismos *target-site* ocasionados por mutações pontuais no gene ALS são responsáveis por proporcionar diferentes padrões. Algumas mutações podem causar resistência apenas às IMI's, outras para SUL's, enquanto outras podem causar resistência a todos os grupos químicos (BECKIE e TARDIF, 2012; YU e POWLES, 2015).

Os objetivos deste trabalho foram: (a) avaliar o nível de resistência de três populações de *B. subalternans* a inibidores da ALS por meio de experimentos de dose-resposta; (b) investigar se as características de resistência se repetem em outras populações e; (c) avaliar se existem casos de resistência múltipla a inibidores da ALS + atrazine e inibidores da ALS + glyphosate em áreas de produção de soja no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Primeira etapa – ensaios de dose-resposta:

Sementes da geração F1 de quatro populações de *B. subalternans*. As populações utilizadas foram provenientes da geração F1, cujos parentais sobreviveram à aplicação de imazethapyr a 106 g ha^{-1} . As sementes foram semeadas em bandejas de plástico (10 x 6 x 2 cm) a 0,5 cm de profundidade, utilizando substrato comercial da marca Carolina®. Após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos de $1,0 \text{ dm}^{-3}$ contendo solo peneirado com teor de argila 21%, teor de areia de 68%, 2,1% de M.O., CTC de $9,8 \text{ mg dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ de 6,4.

Foram utilizadas portanto, três populações com suspeitas de resistência e uma suscetível coletada em área sem histórico de uso de herbicidas (R1, R2, R3 e SUS). As informações de cada população estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Informações das amostras de populações *Bidens* spp. coletadas para os experimentos. Maringá (PR), 2017.

Código da população	Espécie	Município	Estado	Coordenadas geográficas	
				Latitude	Longitude
SUS	<i>B. subalternans</i>	Maringá	PR	23° 23' 47" S	51° 57' 14" O
R1	<i>B. subalternans</i>	Assis Chateaubriand	PR	24° 17' 23" S	53° 32' 18" O
R2	<i>B. subalternans</i>	Balsas	MA	08° 30' 23" S	46° 44' 59" O
R3	<i>B. subalternans</i>	Nova Aurora	PR	24° 34' 29" S	53° 13' 23" O
101_17	<i>B. subalternans</i>	Cascavel	PR	24° 53' 55" S	33° 28' 15" O
141_17	<i>B. subalternans</i>	Campo Mourão	PR	24° 11' 46" S	52° 16' 00" O
144_17	<i>B. subalternans</i>	Engenheiro Beltrão	PR	23° 46' 42" S	52° 16' 24" O
145_17	<i>B. subalternans</i>	Boa Esperança	PR	24° 14' 35" S	52° 49' 38" O
147_17	<i>B. subalternans</i>	Mamborê	PR	24° 20' 14" S	52° 35' 36" O
15_17	<i>B. subalternans</i>	Peabiru	PR	23° 52' 43" S	52° 19' 08" O
184_17	<i>B. subalternans</i>	Floresta	PR	23° 34' 51" S	52° 04' 16" O
20_17	<i>B. subalternans</i>	Engenheiro Beltrão	PR	23° 51' 05" S	52° 18' 37" O
236_17	<i>B. subalternans</i>	São Jorge do Ivaí	PR	23° 27' 27" S	52° 17' 31" O
242_17	<i>B. subalternans</i>	Ourizona	PR	23° 24' 55" S	52° 13' 53" O
261_17	<i>B. subalternans</i>	Jaguapitã	PR	23° 09' 12" S	51° 31' 24" O
343_17	<i>B. subalternans</i>	Maripá	PR	24° 24' 14" S	53° 51' 29" O
352_17	<i>B. subalternans</i>	Bela Vista do Paraíso	PR	23° 05' 06" S	51° 10' 59" O
358_17	<i>B. subalternans</i>	Braganey	PR	24° 51' 02" S	53° 06' 09" O
37_17	<i>B. subalternans</i>	Peabiru	PR	23° 24' 07" S	52° 19' 53" O
395_17	<i>B. subalternans</i>	Nova Aurora	PR	24° 23' 51" S	53° 21' 55" O
407_16	<i>B. subalternans</i>	Uberlândia	MG	19° 02' 04" S	48° 12' 57" O
413_17	<i>B. subalternans</i>	Assis Chateaubriand	PR	24° 33' 03" S	53° 35' 34" O
415_17	<i>B. subalternans</i>	Assis Chateaubriand	PR	24° 21' 05" S	53° 30' 09" O
425_17	<i>B. subalternans</i>	Bandeirantes	PR	23° 05' 38" S	50° 25' 22" O
431_17	<i>B. subalternans</i>	Prado Ferreira	PR	23° 02' 30" S	51° 22' 10" O
532_16	<i>B. subalternans</i>	Araguari	MG	18° 33' 14" S	48° 23' 52" O
548_16	<i>B. subalternans</i>	Guarapuava	PR	25° 27' 22" S	51° 30' 32" O
567_16	<i>B. subalternans</i>	São Desidério	BA	12° 51' 24" S	45° 57' 49" O
568_16	<i>B. subalternans</i>	Formosa do Rio Preto	BA	11° 30' 42" S	46° 10' 53" O
59_17	<i>B. subalternans</i>	Medianeira	PR	25° 18' 36" S	53° 58' 03" O
81_17	<i>B. subalternans</i>	São Miguel do Iguaçu	PR	25° 25' 52" S	54° 16' 11" O
MS35_17	<i>B. subalternans</i>	Laguna Carapã	MS	22° 34' 46" S	55° 09' 59" O
MS41_17	<i>B. subalternans</i>	Laguna Carapã	MS	22° 36' 34" S	55° 13' 05" O
PG1_17	<i>B. pilosa</i>	Ponta Grossa	PR	25° 05' 23" S	50° 03' 29" O
PG31_17	<i>B. pilosa</i>	Palmeira	PR	25° 22' 37" S	50° 00' 54" O
PG33_17	<i>B. pilosa</i>	Lapa	PR	25° 39' 30" S	49° 50' 10" O
PG36_17	<i>B. pilosa</i>	Lapa	PR	25° 44' 10" S	49° 45' 53" O

Foram realizados experimentos em esquema fatorial 8 x 4, em que o primeiro fator foi constituído por oito doses do herbicida e o segundo fator pelas quatro populações. As doses foram equivalentes a 0, 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4 e 8 vezes (x) a dose recomendada para o controle de *Bidens*, conforme a recomendação do fabricante de cada produto (AGROFIT, 2017). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições. Foram realizados três experimentos, um para cada herbicida de grupos químicos diferentes dentro dos inibidores da ALS, sendo eles imazethapyr (imidazolinonas – IMI's), chlorimuron (sulfonilureias – SUL's) e diclosulam (triazolopirimidinas – TRI's). As doses recomendadas (x) foram de 106 g ha⁻¹, 20 g ha⁻¹ e 26,2 g ha⁻¹, respectivamente.

As aplicações dos tratamentos ocorreram em pós-emergência, com as plantas apresentando de 2-3 folhas (aproximadamente 10 cm de altura), com equipamento de pulverização costal, à base de pressão de CO₂ constante, com barra com três pontas de pulverização modelo XR 110.02 espaçadas de 0,5 m. A velocidade de aplicação foi de 1,0 m s⁻¹ e a pressão utilizada foi de 30 psi, o que proporcionou volume de calda de 200 L ha⁻¹.

Foram avaliadas a porcentagem de controle das plantas aos 28 dias após a aplicação (DAA), utilizando a escala de 0-100%, em que zero significa a ausência de sintomas e 100% a morte da planta. Ao final dos experimentos (28 DAA), a parte aérea das plantas foi coletada rente ao solo e colocada em estufa a 60°C por 48 horas para obtenção da massa seca.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, à 5% de probabilidade. Com a utilização do software SigmaPlot 12, as variáveis significativas com o efeito de doses no teste F foram submetidas a análises de regressão utilizando modelos não lineares de dose-resposta, para todos os herbicidas avaliados. O modelo utilizado para a variável de porcentagem de controle visual foi o modelo log-logístico de três parâmetros, proposto por Streibig et al. (1988) (Equação 1) e para a variável massa seca em relação à testemunha, o modelo utilizado foi o de Gompertz, com três parâmetros (Equação 2).

$$Y = a / \{1 + \left[\left(\frac{x}{b} \right) \exp(c) \right]\} \quad \text{Equação 1}$$

$$Y = a * \exp\{- \exp[-b * (x - c)]\} \quad \text{Equação 2}$$

Nos modelos, Y é o controle percentual ou massa seca em relação a testemunha aos 28 DAA (variável dependente); x corresponde a dose do herbicida (g ha^{-1}) (variável independente); a é a assíntota existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável; b é a dose que proporciona 50% da assíntota; e c representa a declividade da curva ao redor de b (ponto de inflexão da curva).

Para observar a dose que proporciona 50% de controle (DC_{50}) ou 50% de massa em relação a testemunha (DM_{50}), bem como as doses para o controle satisfatório das populações (DC_{85} ou DM_{85}) (SANTOS et al., 2014), foram utilizadas as equações inversas, isolando x em função de Y , conforme proposto por Carvalho et al. (2005).

Após calcular a DC_{50} e DC_{85} , foram calculados os fatores de resistência (FR) obtidos pela razão entre DC_{50} da população resistente pela DC_{50} da população suscetível, tanto para dados de porcentagem de controle, quanto para massa seca em relação à testemunha (DM_{50} e DM_{85}) aos 28 DAA.

Segunda etapa - screening em outras populações:

Após identificar os diferentes níveis de resistência, buscou-se avaliar se o padrão de resposta às aplicações dos inibidores da ALS se repetia em outras populações.

Sementes de *Bidens pilosa* e *Bidens subalternans* foram coletadas em áreas de produção de soja, na safra 2016/2017. As sementes foram coletadas em *bulk* (de cinco a sete plantas por local) e armazenadas em saco de papel. Foram anotadas as informações sobre os locais de coleta, tais como, município e coordenadas geográficas das amostras amostragem (Tabela 7).

As sementes de todas as populações foram semeadas em bandejas, da mesma forma como foi descrito na primeira etapa. O transplântio e o solo das unidades experimentais também foram os mesmos, mas as plântulas foram acomodadas em vasos de 0,2 L.

Foi realizado um experimento para cada herbicida, e todas as aplicações foram realizadas em pós-emergência (três folhas) nas 37 populações coletadas, inclusive aquelas utilizadas na primeira etapa (R1, R2, R3 e SUS) para possibilitar a comparação. Os herbicidas e respectivas doses que compuseram cada experimento foram: Exp. 1: imazethapyr (212 g ha^{-1}); Exp. 2: chlorimuron (40 g ha^{-1}); Exp. 3: diclosulam (52 g ha^{-1}); Exp. 4: atrazine ($1500 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) e Exp. 5: glyphosate ($960 \text{ g e.a. ha}^{-1}$). As doses dos inibidores da ALS foram equivalentes as doses de 2x utilizadas na primeira etapa, estabelecidas de modo que a população que sobrevivesse ao tratamento fosse considerada

resistente. O experimentos com os herbicidas atrazine e glyphosate foram adicionados para investigar a possibilidade de existir resistência múltipla.

Os experimentos tiveram quatro repetições e foram delineados inteiramente ao acaso. O método de aplicação e de avaliação foram os mesmos dos utilizados na primeira etapa, porém sem avaliação de massa seca da parte aérea. Para cada população, quatro plantas foram mantidas sem aplicação para servirem de testemunha nas avaliações de porcentagem visual de controle.

Ao final do experimento, os dados de porcentagem de controle aos 28 DAA foram submetidos a análise de variância e analisados pelo teste de Scott-Knott, ambos a nível de 5% de probabilidade. O Pacote estatístico utilizado foi o SISVAR. Utilizou-se o software Qgis.2012 para a confecção de mapas demonstrativos da dispersão de populações para cada herbicida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeira etapa: experimentos de dose-resposta

Conforme o esperado, a população suscetível (SUS) apresentou sensibilidade aos herbicidas imazethapyr, chlorimuron e diclosulam. A resposta desta população aos herbicidas resultou em DC_{85} de 157; 3,03 e 3,72 g ha⁻¹, respectivamente (Tabela 8).

Para as populações com suspeita de resistência, as doses para o controle (85%) com o imazethapyr foram maiores do que oito vezes a dose recomendada do produto (dose x = 106 g ha⁻¹). Para a variável redução de massa em relação à testemunha, a DM_{85} foi 10,8, 8,4 e 44,15 vezes maior do que a dose recomendada, para as populações R1, R2 e R3, respectivamente (Tabela 8).

Os FR para o imazethapyr nas populações variaram de moderados a altos, no entanto, nem mesmo a maior dose aplicada (848 g ha⁻¹) foi suficiente para controlar ou reduzir a massa das plantas resistentes em 85%.

Para o chlorimuron, também foram constatados níveis de resistência semelhantes para R1 e R2 (Tabela 8). Novamente, a população R2 apresentou maior resistência (FR > 15), ao passo em que a população R1 apresentou FR com níveis moderados, de 9,5 (DC_{50}) e 3,9 (DM_{50}). A população R3 apresentou sensibilidade ao chlorimuron, sendo o FR menor que 2,0 e a DC_{85} de 3,85 g ha⁻¹ (Tabela 8 e Figura 1).

Tabela 8. Parâmetros dos modelos, doses (g ha⁻¹) para 50% e 85% de eficácia dos herbicidas inibidores da ALS aplicados em três populações de *Bidens subalternans* resistentes.

		% controle ^{1/}					
Herbicida	População	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	R ²	DC ₅₀	DC ₈₅
Imazethapyr	Sus	86,69	34,95	18,99	0,79	38,87	157
	R1	67,74	150,49	137,96	0,86	317,9	>848
	R2	-	-	-	-	>848	>848
	R3	67,52	51,75	29,13	0,87	91,5	>848
Chlorimuron	Sus	99,48	0,9	1,3615	0,82	1,7	3,03
	R1	73,75	8,2	8,54	0,85	16,3	>160
	R2	77,61	15,21	20,77	0,84	33,3	>160
	R3	89,3	0,67	1,06	0,85	1,25	3,85
Diclosulam	Sus	98,45	0,69	1,23	0,86	2,66	3,72
	R1	96,2264	2,86	2,39	0,86	3,61	8,1
	R2	-	-	-	-	>201	>201
	R3	96,14	1,01	1,54	0,87	1,66	4,25
		% redução de massa seca ^{2/}					
Herbicida	População	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	R ²	DM ₅₀	DM ₈₅
Imazethapyr	Sus	99,78	30,5	0,59	0,84	28,3	570
	R1	80,74	513,74	1,82	0,91	392	1155
	R2	-	-	-	-	>848	>848
	R3	96,69	359,5	0,66	0,91	324	4680
Chlorimuron	Sus	99,99	1,17	1,47	0,85	1,49	3,8
	R1	97,23	106,07	0,9865	0,94	5,88	595
	R2	98,13	25,34	0,53	0,92	23,5	640
	R3	99,36	1,82	0,59	0,87	1,78	34
Diclosulam	Sus	99,91	0,7385	0,89	0,90	0,74	5,2
	R1	99,16	5,98	1,1	0,94	5,85	28,5
	R2	-	-	-	-	>201	>201
	R3	99,78	1,52	0,77	0,94	1,5	14,4

^{1/}Ajuste pelo modelo de Streibig (1988); ^{2/}Ajuste pelo modelo de Gompertz; DC₅₀: dose para 50% de controle; DM₅₀: dose para 50% de massa seca em relação a testemunha; DC₅₀ e DM₅₀ calculadas pelas equações inversas. -: modelo não ajustado.

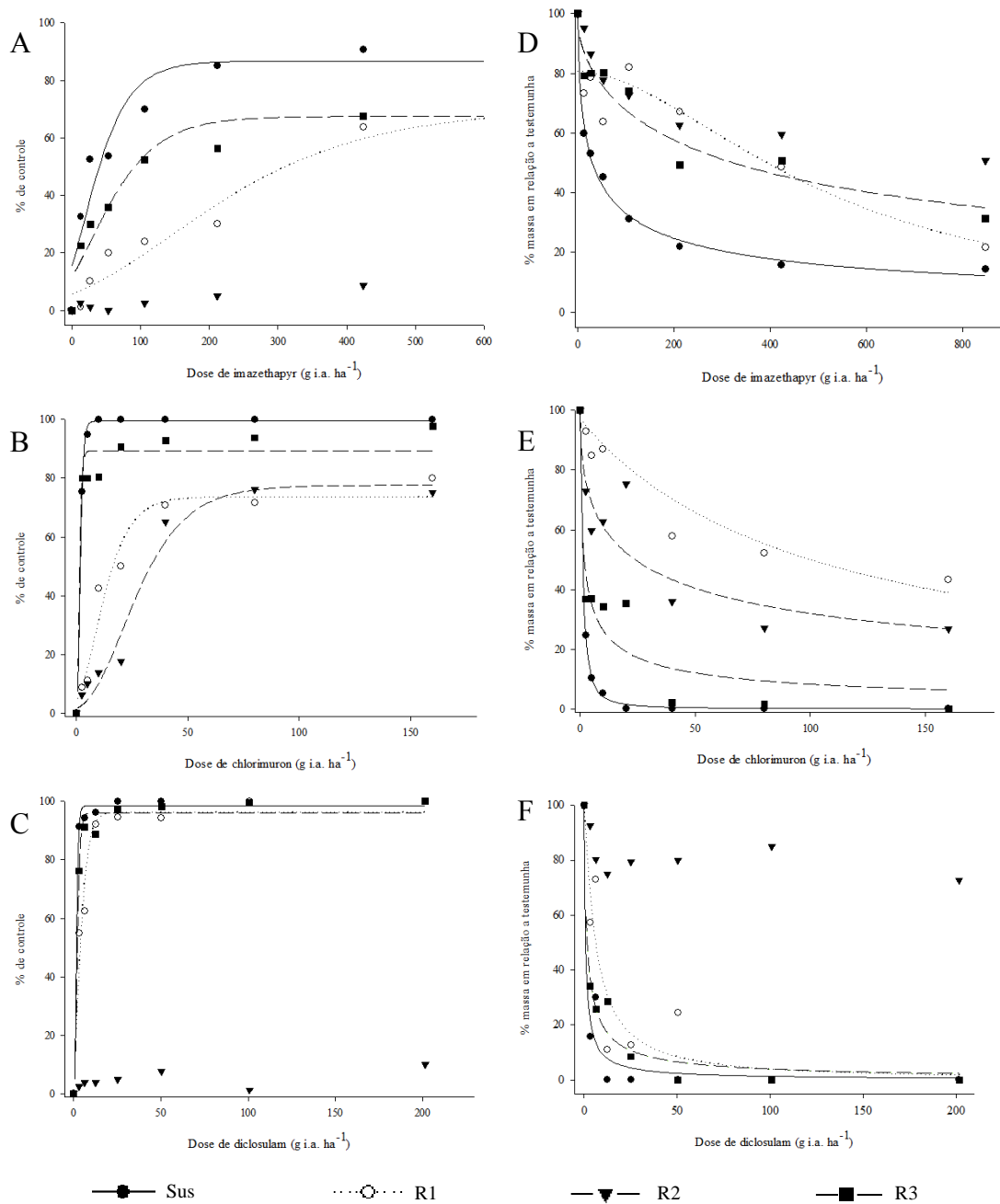


Figura 1. Curvas de dose-resposta em três populações de *B. subalternans* resistentes a inibidores da ALS. A e D) imazethapyr; B e E) chlorimuron; C e F) diclosulam.

Ao avaliar os níveis visuais de injúria causados pelo chlorimuron, as populações constatadas como resistentes (R1 e R2) não atingiram 85% de controle (Tabela 2) mesmo na maior dose aplicada (160 g ha⁻¹). Para os dados de DM₈₅, os valores foram maiores do que 595 g i.a. ha⁻¹, o que indica que são necessárias doses pelo menos 28 vezes maiores do que a recomendada para o controle aceitável destas populações (dose x = 20 g ha⁻¹).

Para diclosulam, apenas a população R2 demonstrou elevados níveis de resistência (Tabela 9). Doses elevadas deste herbicida causaram níveis de injúria muito baixos, e mesmo a maior dose avaliada (201 g ha⁻¹) não foi suficiente para resultar em 50% de eficácia (Figura 1). Apesar da população R1 apresentar FR de 1,4 (DC₅₀) e 7,9 (DM₅₀), doses de 8,1 a 28,5 g ha⁻¹ foram suficientes para controlar ou reduzir a massa seca em níveis de 85%, respectivamente (Tabela 8). O mesmo foi constatado para a população R3, para a qual a dose para 85% de controle foi de apenas 4,25 e 14,4 g ha⁻¹. Visto que a faixa de doses para o controle de *Bidens* pelo herbicida diclosulam é de 25 a 35 g ha⁻¹, observa-se que não há resistência a este herbicida nestas populações (Figura 1).

Tabela 9. Fatores de resistência (FR) baseados no controle (DC₅₀) ou na massa em relação a testemunha (DM₅₀) em três populações de *Bidens subalternans* resistentes a inibidores da ALS.

População	Herbicida	FR (DC ₅₀)	FR (DM ₅₀)
Sus	Imazethapyr	-	-
	Chlorimuron	-	-
	Diclosulam	-	-
R1	Imazethapyr	8,2	13,8
	Chlorimuron	9,6	3,9
	Diclosulam	1,4	7,9
R2	Imazethapyr	>21,8	>29,9
	Chlorimuron	19,6	15,7
	Diclosulam	>75,5	>271,6
R3	Imazethapyr	2,35	11,4
	Chlorimuron	0,73	1,19
	Diclosulam	0,62	2,02

FR: calculado pela razão entre DC₅₀ ou DM₅₀ da população SUS e DC₅₀ ou DM₅₀ da população resistente.

Para *B. pilosa* e *B. subalternans*, a resistência a inibidores da ALS em outras populações é, na maioria das vezes elevada, com FR que podem variar de 10 a >6000 (GELMINI et al., 2002; LAMEGO et al., 2009; TAKANO et al., 2016). Em populações dos estados do Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná, os FR para imazetaphyr apresentam níveis que vão de 1,89 a 10,3, enquanto que para chlorimuron, os FR podem ser de 21,5 a 46,6 (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006). Em contrapartida, no presente trabalho, as três populações consideradas resistentes (R1, R2 e R3) foram mais resistentes a imazethapyr do que ao chlorimuron (Tabela 9), o que também pode acontecer em outras populações de *Bidens* como constatado por Monquero et al. (2000).

A diferença mais evidente observada foi em relação ao diclosulam. As populações R1 e R3 apresentaram FR menores que 2,02, ao passo que a população R2 apresentou níveis elevados de resistência (FR >75) (Tabela 9). Isto demonstra que, apesar da população R1 ser resistente aos herbicidas de outros grupos químicos (imazethapyr – IMI's e chlorimuron – SUL's), não existe necessariamente resistência cruzada ao diclosulam (TRI's). Da mesma forma, a população R3 apresentou resistência apenas a imazethapyr (IMI's). Os resultados indicam que pode haver populações resistentes a todos os grupos dos inibidores da ALS, assim como pode haver resistência a um determinado grupo, mas suscetibilidade a outro.

Ao avaliar o herbicida cloransulam (TRI's), LAMEGO et al. (2009) encontraram elevados FR (>80) em um biótipo de Goiás. Até então, os herbicidas deste grupo ainda não haviam sido avaliados em populações de *B. pilosa* ou *B. subalternans* resistentes (MONQUERO et al., 2000; GELMINI et al., 2002; LAMEGO et al., 2009; TAKANO et al., 2016).

O que define os padrões de resistência cruzada a inibidores da ALS podem ser as mutações que ocorrem no gene ALS, principal mecanismo de resistência a este mecanismo de ação (DENG et al., 2014; YU e POWLES, 2015). Em outras plantas daninhas, algumas mutações causam resistência a todos os grupos químicos, sendo as substituições mais comuns para proporcionar este padrão de resistência cruzada as seguintes: Trp-574-Leu, Ala-122-Thr, Asp-376-Glu e Pro-197-Ser (HEAP, 2017).

Em *Amaranthus hybridus*, a substituição Ala-122-Thn pode resultar em resistência apenas as IMI's (WHARLEY et al., 2006), assim como Ser-653-Thr/Ars em *A. tuberculatus* (PATZOLDT e TRANEL, 2007). Todavia, em *Conyza canadensis*, a substituição Pro-197-Ser confere resistência a todos os grupos, com exceção das IMI's (ZHENG et al., 2011).

Dependendo da substituição de aminoácidos na mesma posição, o padrão de resistência cruzada também pode variar. Por exemplo, as mutações na posição Pro-197 podem resultar em até 11 substituições (TRANDEL et al., 2018). Quando a substituição na Pro-197 é por Leu ou Ser pode ocorrer elevados FR para todos os grupos (IMI's, SULF's, TRI's) como descrito em *Amaranthus palmeri* (NAKKA et al., 2017) e *Eclipta prostrata* (LI et al., 2017). Entretanto, quando a substituição é por uma Gln, pode haver suscetibilidade aos TRI's, como ocorre em *Papaver rhoeas* (MARSHALL et al., 2010), ou Pro-197-His, a qual pode conferir resistência a SULF's mas não aos demais grupos em *Raphanus raphanistrum* (YU et al., 2003).

Em *Bidens subalternans* no Brasil, apenas uma substituição foi detectada proporcionando resistência cruzada ampla, sendo ela a Trp-574-Leu (LAMEGO et al., 2009). No entanto, as diferenças nos padrões de resistência cruzada, tanto aquela encontrada no presente trabalho quanto em outros já descritos sugerem que é possível haver outras substituições no gene ALS relacionadas à resistência, ou até mesmo outros mecanismos *non-target-site*, como metabolização, redução na absorção e/ou translocação e sequestro no vacúolo (YU e POWLES, 2015).

Segunda etapa: screening em outras populações

Não houve diferenças pelo teste de Scott-Knott (5%) nos experimentos com atrazine e glyphosate, sendo que estes herbicidas foram letais para todas as populações. Desta forma, a hipótese de haver alguma população com resistência múltipla a inibidores do fotossistema II e inibidores da EPSPs foi descartada.

Para os três inibidores da ALS, o teste de Scott-Knott resultou em diferentes agrupamentos decorrentes das porcentagens de controle aos 28 DAA (Tabela 10). Ao observar os agrupamentos, foi possível classificar as populações resistentes (R) como aquelas com as menores médias de controle (grupo 'e' do teste de Scott-Knott para imazethapyr e chlorimuron e 'c' para diclosulam). As populações moderadamente resistentes (r) foram aquelas enquadradas nos níveis intermediários de controle (grupos 'b', 'c' e 'd' do teste de Scott-Knott para imazethapyr e chlorimuron e 'b' para diclosulam). As populações consideradas sensíveis (S) foram agrupadas no grupo com as maiores médias de porcentagem de controle (grupo 'a' do teste de Scott-Knott).

Tabela 10. Controle de populações de *Bidens* spp. aos 28 DAA, classificadas quanto a resistência e padrões de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS.

População	Espécie	Imazethapyr		Chlorimuron		Diclosulam		Padrão			
		% controle	Classe	% controle	Classe	% controle	Classe				
SUS	<i>B. subalternans</i>	90,0	a	S	100,0	a	S	100,0	a	S	SUS
R1	<i>B. subalternans</i>	66,3	b	r	55,0	c	r	100,0	a	S	R1
R2	<i>B. subalternans</i>	1,3	e	R	61,3	c	r	0,0	c	R	R2
R3	<i>B. subalternans</i>	67,5	b	r	92,5	a	S	94,5	a	S	R3
101_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	49,5	d	r	15,0	c	R	R2
141_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	49,5	d	r	5,0	c	R	R2
144_17	<i>B. subalternans</i>	53,8	c	r	41,3	d	r	90,0	a	S	R1
145_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	8,8	e	R	0,0	c	R	-
147_17	<i>B. subalternans</i>	73,8	b	r	63,8	c	r	97,5	a	S	R1
15_17	<i>B. subalternans</i>	72,5	b	r	95,0	a	S	99,3	a	S	-
184_17	<i>B. subalternans</i>	27,5	d	r	3,8	e	R	48,8	c	r	-
20_17	<i>B. subalternans</i>	84,8	a	S	80,0	b	r	96,3	a	S	-
236_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	60,0	c	r	0,0	c	R	R2
242_17	<i>B. subalternans</i>	60,0	c	r	90,0	a	S	99,5	a	S	R3
261_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	2,5	e	R	0,0	c	R	-
343_17	<i>B. subalternans</i>	13,8	e	R	43,8	d	r	91,3	a	S	-
352_17	<i>B. subalternans</i>	11,3	e	R	100,0	a	S	20,0	c	R	-
358_17	<i>B. subalternans</i>	78,8	b	r	98,8	a	S	91,3	a	S	R3
37_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	47,5	d	r	32,5	c	r	-
395_17	<i>B. subalternans</i>	76,3	b	r	91,3	a	S	100,0	a	S	R3
407_16	<i>B. subalternans</i>	100,0	a	S	100,0	a	S	100,0	a	S	Sus
413_17	<i>B. subalternans</i>	2,5	e	R	63,8	c	r	0,0	c	R	R2
415_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	68,8	b	r	7,5	c	R	R2
425_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	3,8	e	R	0,0	c	R	-
431_17	<i>B. subalternans</i>	30,0	d	r	0,0	e	R	50,0	b	r	-
532_16	<i>B. subalternans</i>	100,0	a	S	100,0	a	S	100,0	a	S	Sus
548_16	<i>B. subalternans</i>	100,0	a	S	100,0	a	S	100,0	a	S	Sus
567_16	<i>B. subalternans</i>	95,0	a	S	93,8	a	S	91,7	a	S	Sus
568_16	<i>B. subalternans</i>	92,3	a	S	100,0	a	S	100,0	a	S	Sus
59_17	<i>B. subalternans</i>	48,8	c	r	81,3	b	r	100,0	a	S	R1
81_17	<i>B. subalternans</i>	20,0	d	r	41,3	d	r	5,0	c	R	-
MS35_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	37,5	d	r	0,0	c	R	R2
MS41_17	<i>B. subalternans</i>	0,0	e	R	37,5	d	r	1,3	c	R	R2
PG1_17	<i>B. pilosa</i>	0,0	e	R	52,5	c	r	7,5	c	R	R2
PG31_17	<i>B. pilosa</i>	52,5	c	r	100,0	a	S	12,5	c	R	-
PG33_17	<i>B. pilosa</i>	0,0	e	R	36,3	d	r	6,3	c	R	R2
PG36_17	<i>B. pilosa</i>	35,0	d	r	100,0	a	S	100,0	a	S	R3
F		57,71			42,73			78,00			

Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si, à nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. S: sensível (grupo 'a'); r: moderadamente resistente (grupos 'b', 'c' e 'd' para imazethapyr e chlorimuron e grupo 'b' para diclosulam); R: resistente (grupo 'e' para imazethapyr e chlorimuron e grupo 'c' para diclosulam). '-': padrão indefinido. R1: resistente 1 ; R2: resistente 2, R3: resistente 3.

Mais de 81% das amostras foram classificadas como resistente (R) ou moderadamente resistente (r) ao imazethapyr (Tabela 11). No PR, estado com maior número de amostras, apenas duas populações foram classificadas como S ao imazethapyr, coletadas nos municípios de Engenheiro Beltrão e Guarapuava. As demais amostras S se encontram nos estados de MG e BA. Quanto às amostras R e r, todas elas se concentram nas regiões Oeste, Centro-Oeste e Norte do PR (Figura 2).

Tabela 11. Número (nº) e frequência (%) de populações de *Bidens* spp. apresentando resistência ou sensibilidade a inibidores da ALS, atrazine e glyphosate no Brasil.

Classe	Imazethapyr		Chlorimuron		Diclosulam		Atrazine		Glyphosate	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
S	7	18,9	14	37,8	18	48,6	37	100	37	100
r	14	37,8	18	48,6	3	8,1	0	0	0	0
R	16	43,2	5	13,5	16	43,2	0	0	0	0

S: sensível (grupo 'a'); r: moderadamente resistente (grupos 'b', 'c' e 'd' para imazethapyr e chlorimuron e grupo 'b' para diclosulam); R: resistente (grupo 'e' para imazethapyr e chlorimuron e grupo 'c' para diclosulam). Total de populações avaliadas: 37.

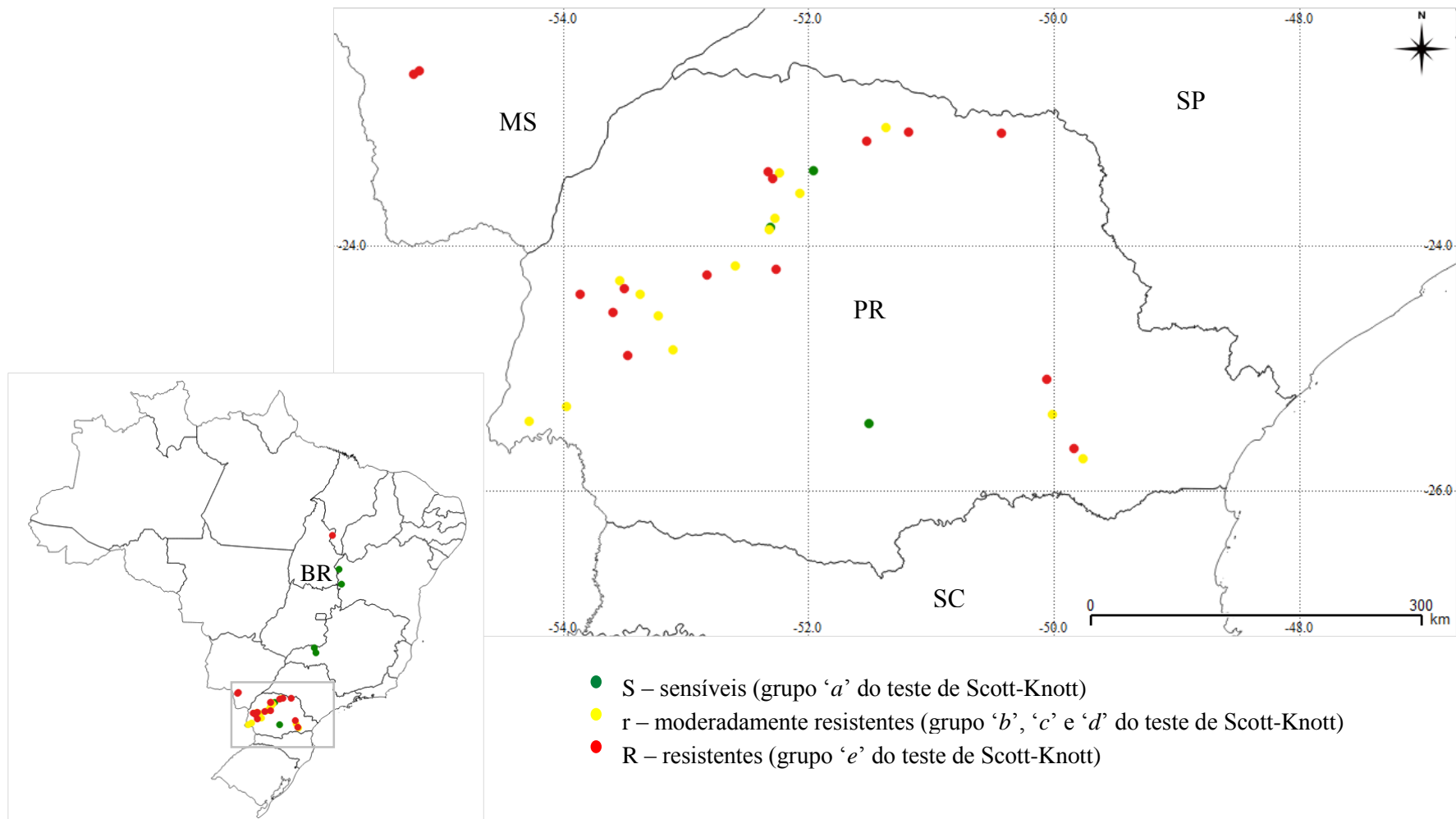


Figura 2. Dispersão de populações de *Bidens* spp. resistentes a imazethapyr no Brasil e no estado do Paraná. Grupo ‘a’ do teste de Scott-knott corresponde a médias maiores do que 84% de controle. Grupos ‘b’, ‘c’ e ‘d’ do teste de Scott-Knott correspondem a médias entre 13,3 e 84% de controle. Grupo ‘e’ do teste de Scott-Knott corresponde a médias inferiores a 13,3% de controle.

A resistência (R ou r) a chlorimuron foi constatada em 62% das populações (Tabela 11). A frequência de populações com maiores níveis de resistência (R) também foi menor para o chlorimuron em relação à imazethapyr. Dentro daquelas classificadas com algum nível de resistência, predominam populações r em relação a R (Tabela 11). No estado do PR, populações R são predominantes na região norte, enquanto populações r se concentram nas regiões oeste e centro-oeste. As amostras S também concentram-se nos estados de MG e BA, entretanto no PR, existem populações S nas regiões centro-oeste, sul e norte (Figura 3).

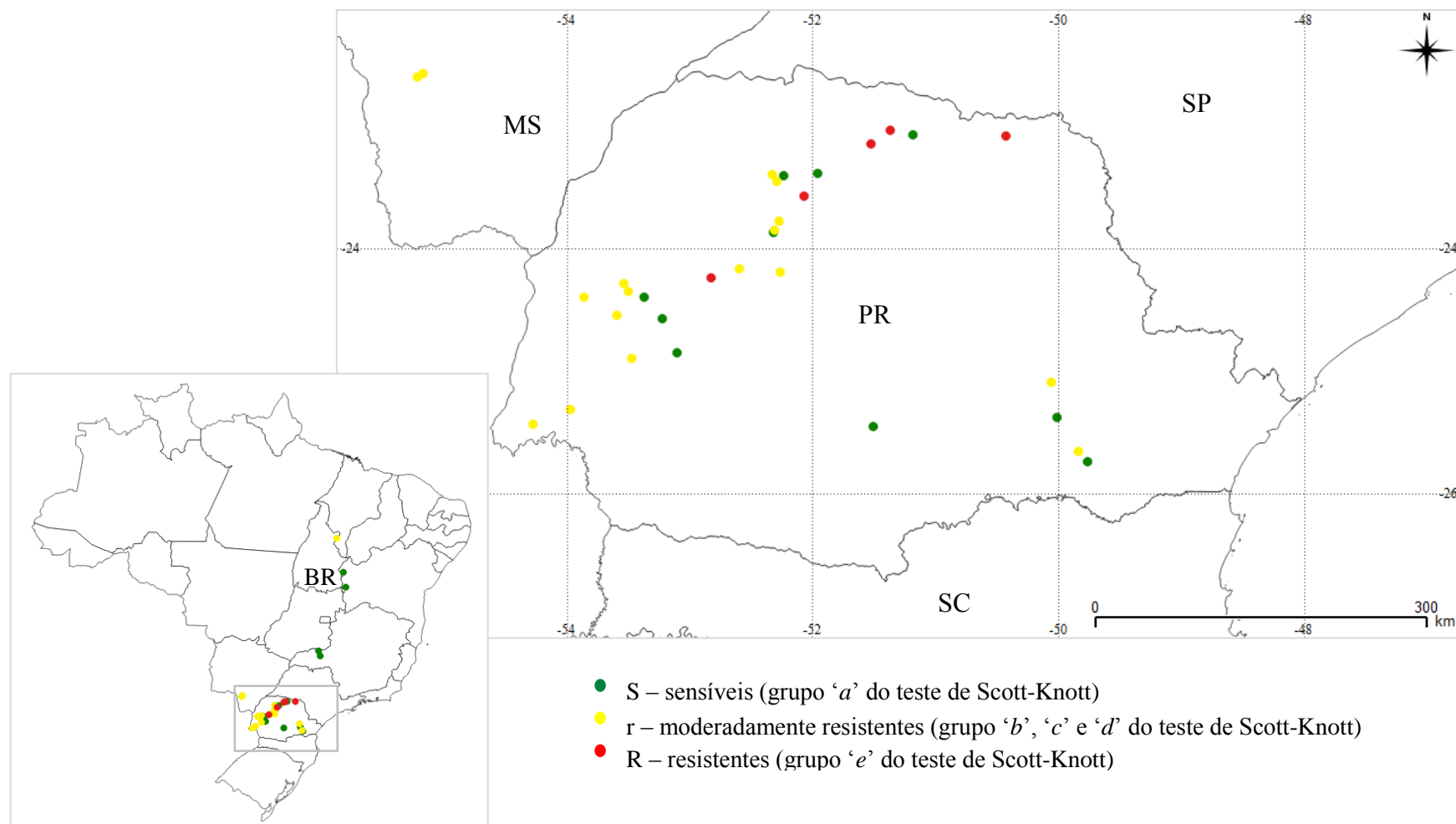


Figura 3. Dispersão de populações de *Bidens* spp. resistentes a chlorimuron no Brasil e no estado do Paraná.

Grupo ‘a’ do teste de Scott-knott corresponde a médias maiores do que 90% de controle. Grupos ‘b’, ‘c’ e ‘d’ do teste de Scott-Knott correspondem a médias entre 8,8 e 90% de controle. Grupo ‘e’ do teste de Scott-Knott corresponde a médias inferiores a 8,8% de controle

O diclosulam foi o herbicida que resultou em menor número de amostras R ou r (51%). Dentro desta classificação, 16 amostras foram classificadas como R e apenas 3 como r. Isto indica que as populações resistentes apresentam, na maioria das vezes, nenhum ou baixos níveis de controle (Tabela 11). As populações S também encontram-se nos estados de MG e BA, todavia, para este herbicida, existem populações S dispersas no PR (Figura 4).

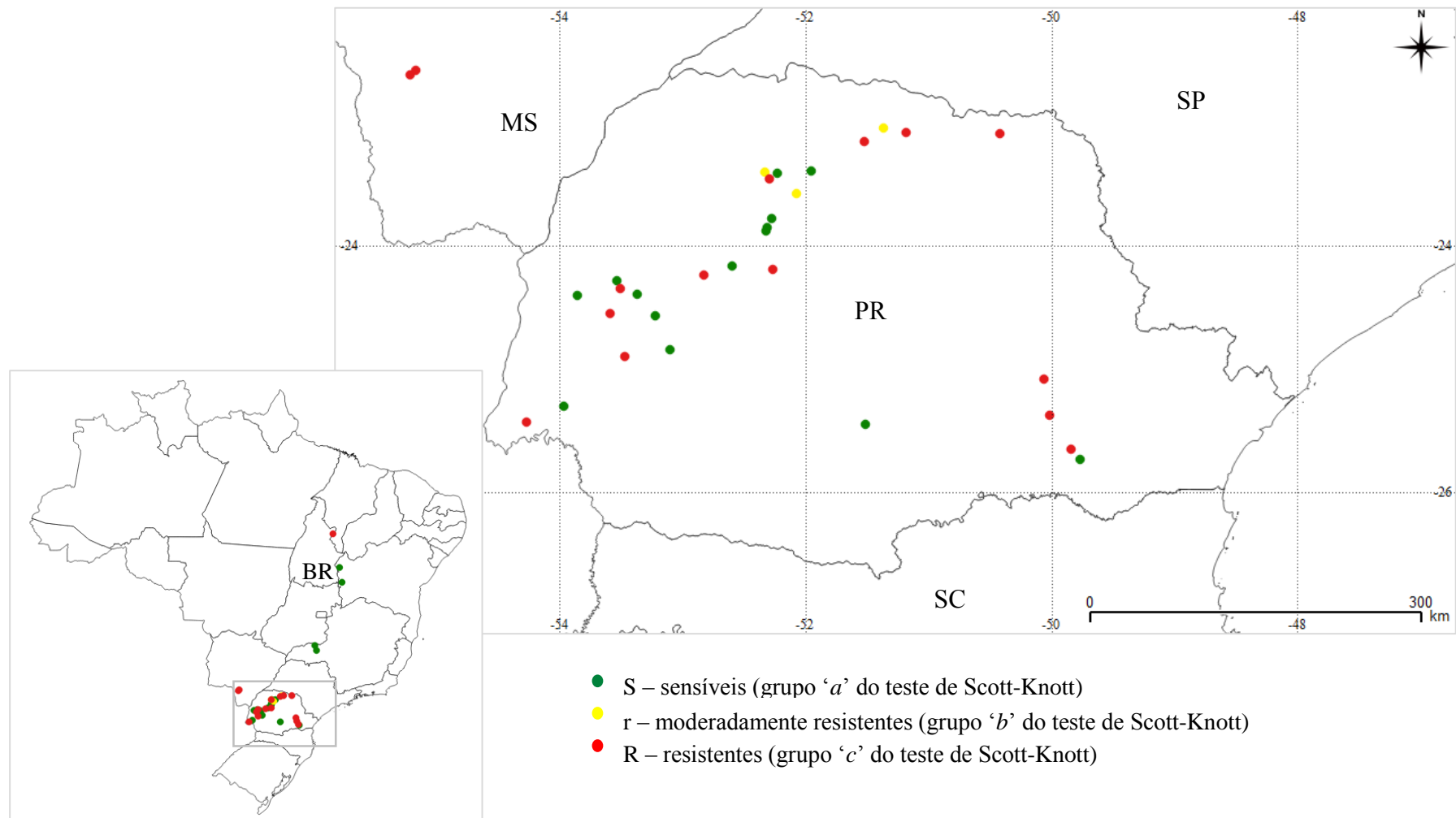


Figura 4. Dispersão de populações de *Bidens* spp. resistentes a diclosulam no Brasil e no estado do Paraná. Grupo 'a' do teste de Scott-knott corresponde a médias maiores do que 90% de controle. Grupo 'b' do teste de Scott-Knott correspondem a médias entre 20 e 90% de controle. Grupo 'c' do teste de Scott-Knott corresponde a médias inferiores a 20% de controle.

Ao observar os resultados para os três herbicidas simultaneamente, foi possível classificar cada população de acordo com a semelhança com os padrões de resistência cruzada das populações avaliadas na primeira etapa deste trabalho (SUS, R1, R2 e R3). Das 37 amostras avaliadas, quatro apresentaram o padrão R1, dez o padrão R2 e cinco o padrão R3. Seis amostras foram semelhantes ao padrão SUS. O restante, 12 amostras, apresentaram padrões diferentes dos identificados no presente trabalho (Tabela 11). O padrão de resistência cruzada que predomina no Brasil é o padrão R2, com resultados de R para imazethapyr, r para chlorimuron e R para diclosulam.

Herbicidas do grupo das IMI's e SUL's foram os primeiros inibidores da ALS comercializados para a cultura da soja no Brasil, no início da década de 1980. Sabendo que a seleção de biótipos resistentes a inibidores da ALS é rápida, o maior tempo de utilização destes produtos pode explicar a alta frequência de populações resistentes em relação ao diclosulam (TRI's), o qual passou a ser comercializado a partir de 1993 (MANZUR e FALCON, 1989; BECKIE e TARDIF, 2012; DENG et al., 2017). Atualmente, os inibidores da ALS voltaram a ser utilizados mais intensamente para o controle de plantas resistentes ao glyphosate, como buva e capim-amargoso (BRAZ et al., 2017; OLIVEIRA NETO et al., 2017). Outros fatores evidenciam que o uso de diclosulam foi relativamente menor em relação a imazethapyr e chlorimuron. Herbicidas à base de imazethapyr e chlorimuron são fabricados por oito e nove empresas, respectivamente (AGROFIT, 2017), enquanto herbicidas à base de diclosulam são fabricados por uma única empresa até o momento. Isto somado a outros fatores faz com que o preço do diclosulam seja relativamente maior em relação aos demais, o que também influencia em menor adoção pelos agricultores.

Não foi possível constatar qualquer relação entre os padrões observados e a localização geográfica dos locais de coleta das sementes. Por exemplo, na região oeste do PR são encontradas populações com padrões R1, R2, R3 e Sus (Figura 5). Existe elevada variabilidade genética entre biótipos de *Bidens* spp. em uma mesma área, o que pressupõe que a frequência de alelos de resistência seja alta, podendo haver seleções de indivíduos resistentes em pouco tempo e com diferentes características de resistência cruzada (VIDAL et al., 2005).

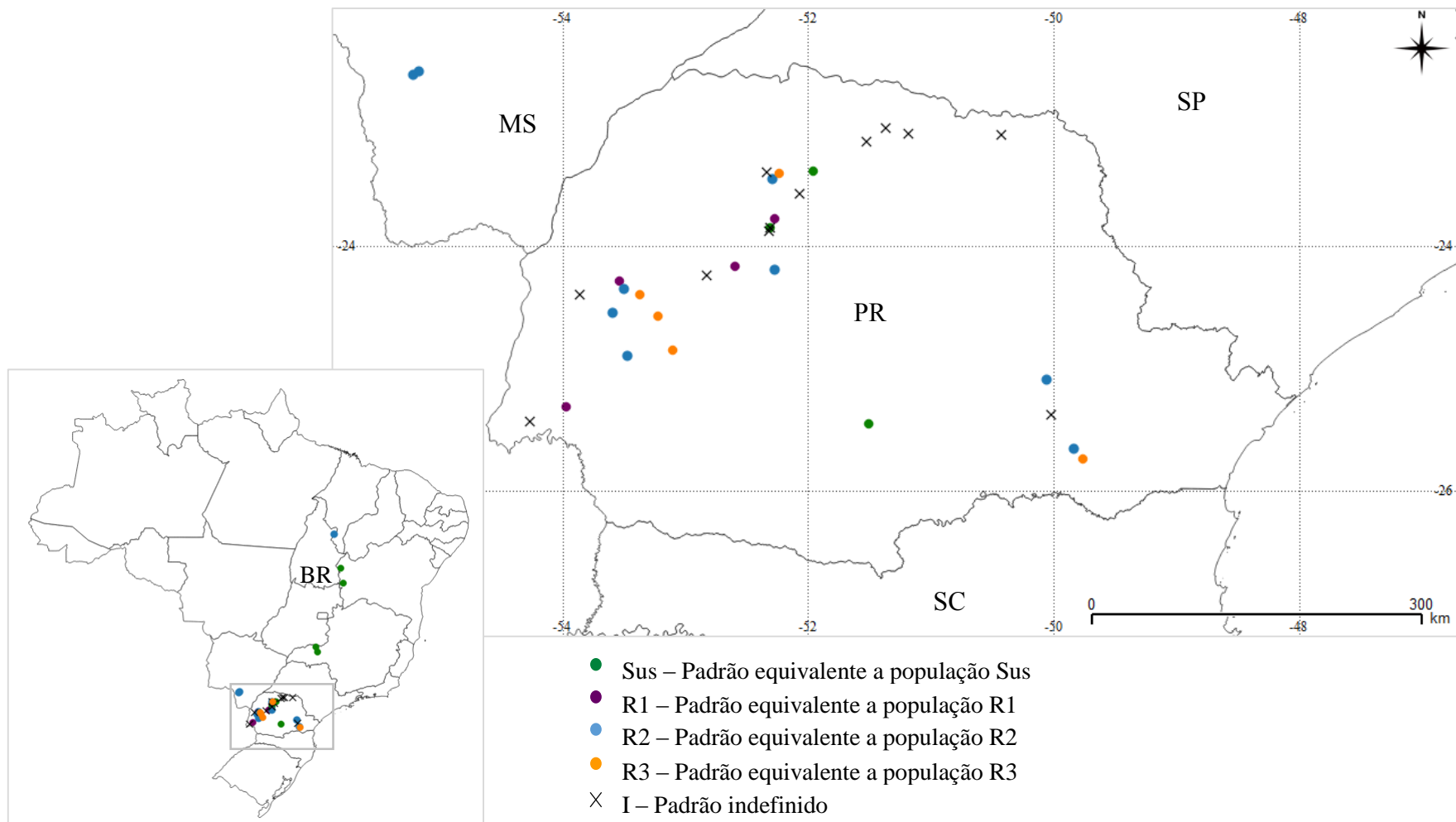


Figura 5. Dispersão de populações de *Bidens* spp. com diferentes padrões de resistência cruzada a inibidores da ALS no Brasil. R1: moderadamente resistente (r) a imazethapyr, resistente (R) a chlorimuron e sensível (S) a diclosulam. R2: r a chlorimuron e R a imazethapyr e diclosulam. R3: r a imazethapyr e S a chlorimuron e diclosulam.

Em *Bidens pilosa*, indivíduos podem apresentar similaridade genética mesmo localizados em municípios distantes. O fato das sementes de *Bidens* spp. serem facilmente transportadas por animais e máquinas agrícolas pode resultar em fluxo gênico (VIDAL et al., 2007). No presente trabalho, populações com padrões de resistência semelhantes foram encontrados tanto no oeste paranaense, quanto no estado do Maranhão (amostra R2). O transporte de colhedoras de grãos entre áreas de produção de soja pode ser também um mecanismo importante de dispersão da resistência de *Bidens* spp., fazendo com que características semelhantes de resistência cruzada sejam encontradas em locais distantes. Este sentido de dispersão, do Paraná para o centro-norte do Brasil também já foi constatado para capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente a glyphosate, para o qual observou-se aumento gradativo da frequência de resistência nos estados do Mato Grosso, Bahia e Goiás com o decorrer das safras (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017).

Em cada população pode haver variabilidade no gene ALS, com indivíduos apresentando diferentes alelos de resistência (diferentes mutações). Especificamente, também pode haver níveis variados de pressão de seleção (diferentes herbicidas e frequência de utilização). Por último, pode haver transporte de sementes de *Bidens* spp. entre propriedades. Tais fatores, isoladamente ou em conjunto, podem explicar a existência de variabilidade nas características de resistência, conforme observado neste trabalho.

O “ranking” de frequência de amostras de *Bidens* spp. resistentes a inibidores da ALS baseado nas populações avaliadas é de imazethayr > chlorimuron > diclosulam. Para a classificação colorida como vermelho (R), os herbicidas com maior número de populações resistentes foram imazethapyr e diclosulam. O herbicida que mais apresentou populações classificadas na cor amarela (r) foi o chlorimuron. Na cor verde (S), o herbicida que mais apresentou populações nesta classificação foi o diclosulam. Estas informações não permitem afirmar que a recomendação de aplicações de herbicidas de grupos que apresentam menor número de casos de resistência seja segura, visto que a seleção de biótipos resistentes a inibidores da ALS pode ocorrer rapidamente. Desta forma, recomenda-se a utilização de herbicidas alternativos. Algumas opções eficientes para o controle de *Bidens* spp. são glyphosate e amônio glufosinate em pós-emergência (BRAZ et al., 2011) e flumioxazin em pré-emergência (OLIVEIRA NETO et al., 2010), entre outros.

CONCLUSÕES

Não foram constatados casos de resistência a glyphosate e atrazine nas populações de *Bidens* spp. avaliadas.

A resistência cruzada de *Bidens* spp. a inibidores da ALS ocorre em alta frequência no Brasil, sobretudo no estado do Paraná. Foi demonstrado que pode haver diferentes padrões de resistência cruzada a inibidores da ALS em *Bidens* spp., com fatores de resistência variando de 1,4 a >271. Foram encontrados pelo menos três padrões distintos, os quais se repetem dentro as populações. São eles: resistência a imazethapyr, chlorimuron e diclosulam (R2), resistência a imazethapyr e chlorimuron (R1) e resistência apenas a imazethapyr. Os padrões identificados não se concentram em regiões específicas, mas encontram-se geograficamente dispersos em diferentes áreas de produção.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT – Sistema Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 28 dez. 2017.
- BECKIE, H.J.; TARDIF, F.J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v.35, n.1, p.15-28, 2012.
- BRAZ, G.B.P.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; DAN, H.A.; OLIVEIRA NETO, A.M.; SANTOS, G.; FRANCISCHINI, A.C.; TAKANO, H.K. Herbicidas alternativos no controle de *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla* resistentes a inibidores de ALS na cultura do algodão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, n.2, p.74-85, 2011.
- BRAZ, G.B.P.; OLIVEIRA JR., R.S.; ZOBIOLE, L.H.S.; RUBIN, R.S.; VOGLEWEDE, C.; CONSTANTIN, J.; TAKANO, H.K. Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) control in no-tillage in soybean with diclosulam plus halauxifen-methyl. **Weed Technology**, v.31, n.2, p.184-192, 2017.
- CARVALHO, S.J.P.; LOMBARDI, B.P.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, v.23, n.3, p.535-542, 2005.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.513-518, 2002.
- CRUZ, R.A.; FERNÁNDEZ-MOREO, P.; OZUNA, C.V.; ROJANO-DELGADO, A.M.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; DOMINGUEZ-VELEZUELA, J.A.; BARRO, F.; PRADO, R. Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1, p.1-12, 2016.
- DENG, W.; CAO, Y.; YANG, Q.; LIU, M.J.; MEI, Y.; ZHENG, M. Different cross-resistance patterns to AHAS herbicides of two tribenuron-methyl resistant flixweed (*Descurainia sophia* L.) biotypes in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.112, n.1, p.26-32, 2014.
- DENG, W.; YANG, Q.; ZHANG, Y.; JIAO, H.; MEI, Y.; LI, X.; ZHENG, M. Cross-resistance patterns to acetolactate synthase (ALS)- inhibiting herbicides of flixweed (*Descurainia sophia* L.) conferred by different combinations of ALS isozymes with a Pro-197-Thr mutation or a novel Trp-574-Leu mutation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.136, n.1, p.41-45, 2017.
- GARCIA, M.D.; NOUWENS, A.; LONHIENNE, T.G.; GUDDAT, L.W. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by diferente herbicide families. **PNAS**, v.1, p.1-10, 2017.
- GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M.; VOLL, E.; ADEGAS, F.S. Identificação de biótipo de picão-preto (*Bidens subalternans*) resistente a atrazine. In.: XXX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. 2008. **Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, p.216-217, 2008.

GELMINI, G.A.; VICTÓRIA FILHO, R.; NOVO, M.C.S.S.; ADORYAN, M.L. Resistência de *Bidens subalternans* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase utilizados na cultura da soja. **Planta Daninha**, v.20, n.2, p.319-325, 2002.

GROMBONE-GUARATINI, M.T.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Reproductive biology in species of *Bidens* L. (Asteraceae). **Scientia Agricola**, v.16, n.2, p.185-189, 2004.

HEAP, I. The international Survey of Herbicide Resistant Weeds. ALS mutation data base. Disponível em: <http://weedsociety.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>, acesso em 11 dez. 2017.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2ª ed. São Bernardo do Campo: Basf, 1999. 978p.

LAMEGO, F.P.; CHARLSON, D.; DELATORRE, C.A.; BURGOS, N.R.; VIDAL, A.R. Molecular basis of resistance to ALS-inhibitor herbicides in Greater beggarticks. **Weed Science**, v.57, n.1, p.474-481, 2009.

LI, D.; LI, X.; YU, H.; WANG, J.; CUI, H. Cross-resistance of eclipta (*Eclipta prostrate*) in China to ALS inhibitors due to a Pro-197-Ser point mutation. **Weed Science**, v.65, n.5, p.547-556, 2017.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; ABREU, A.G.; GROMBONE-GUARATINI, M.T.; TOLEDO, R.E.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistance and differential susceptibility of *Bidens pilosa* and *B. subalternans* biotypes to ALS-inhibiting herbicides. **Scientia Agricola**, v.63, n.2, p.139-145, 2006.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; TAKANO, H.K.; OLIVEIRA JR., R.S.; CAVENAGHI, A.L.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sougrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v.65, n.2, p.285-264, 2017.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 7.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014. 341p.

MARSHALL, R.; HULL, R.; MOSS, S.R. Target site resistance to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas* and *Stellaria media* biotypes from the UK. **Weed Research**, v.50, n.5, p.621-630, 2010.

MANZUR, B.J.; FALCO, C. The development of herbicide resistant crops. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, v.4, p.441-470, 1989.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DIAS, C.T.S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v.18, n.3, p.419-425, 2000.

NAKKA, S.; THOMPSON, C.R.; PETERSON, D.E.; JUGULAM, M. Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, v.65, n.6, p.681-689, 2017.

OLIVEIRA NETO, A.M.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR., R.S.; GUERRA, N.; DAN, H.A.; ALONSO, D.G.; BLAINSKI, E.; SANTOS, G. Estratégias de manejo de inverno e verão visando ao controle de *Conyza bonariensis* e *Bidens pilosa*. **Planta Daninha**, v.28, n.3, p.1107-1116, 2010.

OLIVEIRA NETO, A.M.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR.; R.S.; GUERRA, N.; BLAINSKI, E.; DAN, H.A.; ALONSO, D.G. Fall management of fleabane based on glyphosate+2,4-D, MSMA and glufosinate applied isolated or in tank mixture with residual herbicides. **African Journal of Plant Science**, v.11, n.5, p.151-159, 2017.

PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J. Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v.55, n.5, p.421-428, 2007.

STREIBIG, J. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v.28, n.1, p.479-484, 1988.

TAKANO, H.K.; OLIVEIRA JR.; R.S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P.; FRANCHINI, L.H.M.; BURGOS, N.R. Multiple resistance to atrazine and imazethapyr in hair beggarticks (*Bidens pilosa*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.40, n.5, p.547-554, 2016.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R.; HEAP, I.M. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Disponível em: <http://weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>, acesso em 22 jan 2018.

VIDAL, R.A.; LAMEGO, F.P.; RESENDE, L.V.; DA-SILVA, P.R.; DELATORRE, C.A.; TREZZI, M.M. Similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.23, n.3, p.551-556, 2005.

VIDAL, R.A.; NUNES, A.L.; RESENDE, L.V.; LAMEGO, F.P.; SILVA, P.R. Análise genética de genótipos de *Bidens pilosa* através da técnica RAPD. **Scientia Agraria**, v.8, n.4, p.399-403, 2007.

WHARLEY, C.M. WILSON, H.P.; WESTWOOD, J.H. ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. **Weed Science**, v.54, n.3, p.828-832, 2006.

YU, Q.; POWLES, S.B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p.1340-1350, 2015.

YU, Q.; ZHANG, X.Q.; HASHEM, A.; WALSH, M.J.; POWLES, S.B. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science**, v.51, n.6, p.831-838, 2003.

ZHENG, D.; KRUGER, G.R.; SINGH, S.; DAVIS, V.M.; TRANEL, P.J.; WELLER, S.C.; JOHNSON, W.G. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest Management Science**, v.67, n.2, p.1486-1492, 2011.

**CAPÍTULO 3. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE PICÃO-PRETO (*Bidens
subalternans*) COM DIFERENTES PADRÕES DE RESISTÊNCIA
CRUZADA A INIBIDORES DA ALS**

Investigação dos mecanismos de resistência de populações de picão-preto (*Bidens subalternans*) com diferentes padrões de resistência cruzada a inibidores da ALS

RESUMO – Algumas populações de *B. subalternans* podem apresentar resistência a diferentes herbicidas e com diferentes níveis aos inibidores da ALS. O mecanismo de resistência entre estas populações podem ser diferentes, como por exemplo com mutações em diferentes pontos do gene ALS. O objetivo deste trabalho foi de avaliar se existem diferentes mutações ou indícios de resistência pela metabolização pelas enzimas P450. Três populações com diferentes padrões de resistência cruzada mais uma população suscetível tiveram o DNA extraído e realizou-se a amplificação do gene ALS para o sequenciamento da cadeia de ácidos nucleicos. Duas populações e mais uma suscetível receberam os herbicidas com ou sem o anterior tratamento com organofosforados malathion e butóxido de piperolina (PBO). Não foram encontradas mutações nas regiões da Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377 e Trp-574, indicando que a resistência não é causada por substituições nestas posições. Observou-se maiores níveis de injúria quando os herbicidas diclosulam e chlorimuron são aplicados após os organofosforados para a população R1 e R2, respectivamente, o que sugere que a resistência a estes herbicidas pode ocorrer pela ação da metabolização por enzimas P450.

Palavras-chaves: Mutação. Citocromo P450 monoxigenase. Malathion. PBO.

Investigation of resistance mechanisms in beggarticks (Bidens subalternans) populations with different cross-resistant patterns to ALS-inhibitors

ABSTRACT – Some *Bidens subalternans* populations can have resistance to different herbicides and with different levels to ALS-inhibitors. The resistance mechanisms between populations can be different, as with point mutation in several residues in ALS gene. The objective of this work was if there are different mutations or indications of metabolism resistance by cytochrome P450 monooxygenases. Three populations with different resistance patterns and a susceptible population were DNA extracted and was realized the ALS amplification gene to sequencing a acid nucleotide sequence. Two populations and a susceptible populations receive the herbicides applications with or without previous organophosphate, malathion and pirimiphos methyl (PBO). No mutations were found in residues Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377 and Trp-547, indicating that resistance does not occur because amino acid substitutions in these residues. It was observed higher injury levels when the herbicides diclosulam and chlorimuron were sprayed after organophosphate treatments for R1 and R2 populations, respectively, which suggests that resistance to herbicides can occur by P450 metabolism.

Keywords: Mutation. Cytochrome P450 monooxygenase. Malathion. PBO

INTRODUÇÃO

Os herbicidas inibidores da enzima Acetolactato Sintase (ALS) inibem a atuação desta enzima, interrompendo a produção de aminoácidos primários como valina, leucina e isoleucina, o que impede a formação de proteínas, tanto de enzimas e como estruturas que são essenciais para o crescimento dos vegetais (BECKIE e TARDIF, 2012). Estes herbicidas são utilizados na agricultura para o controle de diversas plantas daninhas mono e dicotiledôneas, apresentam-se seletivos para várias culturas, são utilizados em baixas doses e possuem baixa toxicidade para mamíferos (YU e POWLES, 2015).

O uso intensivo dos herbicidas que apresentam este mecanismo de ação tem selecionado espécies de plantas daninhas resistentes em todas as partes do mundo. No banco de dados “International Survey of Herbicide Resistance Weeds” (weedscience.org) existem 48 relatos de espécies resistentes a inibidores da ALS. No Brasil, já foram relatados 29 casos em 19 diferentes espécies (HEAP, 2018).

O mecanismo de resistência a inibidores da ALS mais frequentemente descrito está relacionado com a alteração no sítio de ação dos herbicidas. Nestes casos, mutações no gene ALS alteram a sequência de aminoácidos e a enzima ALS codificada pelo gene torna-se estruturalmente diferente. Isto anula a ligação sítio-herbicida e as plantas resistentes apresentam o funcionamento normal da enzima ALS mesmo após absorverem o herbicida (DÉLYE et al., 2015).

O gene ALS apresenta entre 1700 e 2100 *pb* e cinco regiões de domínio (domínios C, A, D, E e B). Estas regiões são locais conservados do gene que variam minimamente entre espécies e populações (ZHENG et al., 2011; MCELORY et al., 2013). No total, já foram relatadas mutações em todos os domínios, configurando diferentes níveis de resistência entre espécies de plantas daninhas. Existem oito posições de aminoácidos nas quais já foram identificadas substituições de nucleotídeos que causam resistência, sendo elas: Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574 Ser-653 e Gly-654 (TRANDEL et al., 2018).

As mutações representam o principal mecanismo de resistência a inibidores da ALS em plantas daninhas. Porém, outros mecanismos são conhecidos, como por exemplo a metabolização dos herbicidas pelas enzimas P450 monooxigenases. As P450 são responsáveis por transformar a molécula herbicida em um produto atóxico e os biótipos que apresentam maior atividade destas enzimas podem se desintoxicar rapidamente, caracterizando a resistência (YUAN et al., 2005). As moléculas do grupo dos organofosforados como malathion e butóxido de piperolina (PBO) são inibidores da P450 em insetos. A utilização destas moléculas em

plantas com a intenção de inibir a atividade da P450 tem sido avaliada em culturas e plantas daninhas (OWEN et al., 2012). Biótipos de plantas daninhas resistentes podem apresentar elevada atividade destas enzimas, o que pode, em alguns casos, levar o herbicida a apresentar eficiência após o tratamento com malathion e PBO, resultando em efeito sinérgico entre herbicidas e os organofosforados (BUSI et al., 2016). Este efeito já foi verificado, por exemplo, em *Echinochloa phyllopogon* em relação a penoxulan (YASUOR et al., 2009), *Echinochloa crus-galli* para azimsulfuron e penoxulam (SONG et al., 2017) e *Amaranthus tuberculatus* para cloransulam e imazethapyr (GUO et al., 2015).

Plantas conhecidas como picão-preto (*Bidens* spp.) apresentam biótipos resistentes a inibidores da ALS no Brasil (CHRISTOFFOLETI, 2002). Esta planta daninha está presente em culturas anuais em praticamente todo o território brasileiro e falhas no controle com inibidores da ALS estão sendo observadas em áreas de cultivo de soja convencional (não tolerante a glyphosate) e também em situações em que estes herbicidas são aplicados para o controle de plantas daninhas em outros cultivos como feijão, milho e algodão. Em um biótipo de *Bidens subalternans* do estado de Goiás, a mutação que substitui a Trp-547 por Ser é o mecanismo que proporciona resistência aos herbicidas inibidores da ALS (LAMEGO et al., 2009).

Nós temos identificado diferentes padrões de resistência cruzada aos inibidores da ALS em três populações de *Bidens subalternans* (R1, R2 e R3) nos dois capítulos iniciais deste trabalho e isto pode ser causado por diferentes mutações no gene ALS ou por diferentes mecanismos de resistência. Até então, não havia a hipótese de outro mecanismo de resistência em populações de picão-preto, mas é possível que ocorram mutações em outras posições do gene ALS. É possível também que a resistência possa ser ocasionada pela metabolização dos herbicidas por enzimas P450 monooxigenases. Os objetivos deste trabalho foram investigar se existem mutações no gene ALS que conferem resistência em populações de *B. subalternans* e avaliar a resposta de populações de *B. subalternans* resistentes a inibidores da ALS após a aplicação de inibidores da P450.

MATERIAL E MÉTODOS

Primeira etapa - sequenciamento do gene ALS:

Material vegetal

Sementes da geração F1 de quatro populações de *Bidens subalternans* (uma suscetível – SUS e três resistentes – R1, R2 e R3) foram semeadas em bandejas (10 cm x 5 cm x 2 cm) contendo substrato comercial MacPlant® e após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos de 1,0 dm³ preenchidos com o mesmo substrato. Cinco plântulas de cada população foram transplantadas e mantidas em casa de vegetação. Com exceção das suscetíveis, as demais populações receberam o tratamento de 106 g ha⁻¹ de imazethapyr no estádio de 2-3 folhas. Três plantas de cada população (R1, R2 e R3) que sobreviveram as aplicações após 21 dias, mais três plantas da população suscetível foram encaminhadas para o Laboratório de Eletroforese Vegetal da Universidade Estadual de Maringá para a extração do DNA.

Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada em duplicata com a utilização de detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Três a quatro folhas de cada planta foram maceradas em N₂ líquido e uma alíquota de aproximadamente 300 mg do macerado foi adicionada em tubos de 2000 µL. Foi adicionado 700 µL de tampão de extração (TE) contendo TrisHCl pH 7,5 a 1,0M, NaCl a 5,0M, EDTA pH 8,0 a 0,5M, CTAB a 1,0%, β-mercapta etanol a 0,2%. As amostras foram homogenizadas e incubadas em banho maria a 65°C por 60 min. Após este período, foi adicionado 800 µL de clorofórmio isoamílico (24:1) e os tubos foram invertidos por 5 min e posteriormente centrifugados a 10000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Recuperou-se o sobrenadante em novos tubos e o processo com clorofórmio isoamílico foi repetido. Após recuperar o sobrenadante novamente, foi adicionado isopropanol (60% do volume de cada tubo) e realizou-se a homogeneização dos tubos para observação dos *pellets*. Manteve-se as amostras estocadas *overnight* a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se uma lavagem com 800 µL de etanol gelado (70%) com centrifugação à temperatura ambiente (10000 rpm por 10 min). O sobrenadante foi descartado novamente e foram adicionados 400 µL de tampão TE e 4,0 µL de RNase. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2 h e guardadas a 4°C por 24 h. Adicionou-se 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio isoamílico (24:1) e realizou-se a homogeneização. Foi realizada uma centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, à temperatura

ambiente e o sobrenadante resultante foi recuperado em novos tubos. Adicionou-se 400 µL de clorofórmio isoamílico para lavagem e centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi recuperado e adicionou-se isopropanol (60% do volume de cada tubo) e 25 µL de NaCl a 5M. As amostras foram misturadas por inversão por 2 min para formação dos *pallets* e foram mantidas *overnight* a -20°C. Foi realizada uma centrifugação a 4°C (10000 rpm por 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 1000 µL de etanol gelado (70%) e foi realizada uma lavagem com centrifugação nas mesmas condições da anterior. Descartou-se o sobrenadante e o DNA foi suspenso em 100 µL de tampão *buffer*. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro PicoDrop para a avaliação da qualidade da extração.

Desenho dos Primers

Os *primers* utilizados para amplificação do DNA foram os mesmos utilizados por Lamago et al. (2009), os quais foram desenhados baseando-se na sequência do gene ALS de *Bidens pilosa* (Gen Bank: AJ514934.1 e AJ514934.2). Optou-se por realizar a amplificação de três fragmentos do gene, separando o gene em região 1 (domínios C, A e D), região 2 (região entre os domínios D e B) e região 3 (domínios B e E). A região 1 corresponde à sequência onde se encontram os resíduos 122, 197, e 205. A região 2 não apresenta sequência com domínios mas apresenta os resíduos 376 e 377. A região 3 apresenta a sequência que passa pelos resíduos 574, 653 e 654 (Figura 6). Portanto, foi utilizada uma sequência de *primer* para cada região: 5'-AACGCGAAGGCGTCACCCACGTCTT-3' e 3'-GCCCCATCAAAGTACTAGCAACCGG-5' (região 1); 5'-CCGGTTGCTAGTACTTTGATGGGGC-3' e 3'-CCACCCGAAGTCAACCATTGTCTCG-5' (região 2); 5'-CGGCCAGTTTTATAAATATAATAA-3' e 3'-CACCCGCCYGGAATCATCGGCRAAC-5' (região 3).

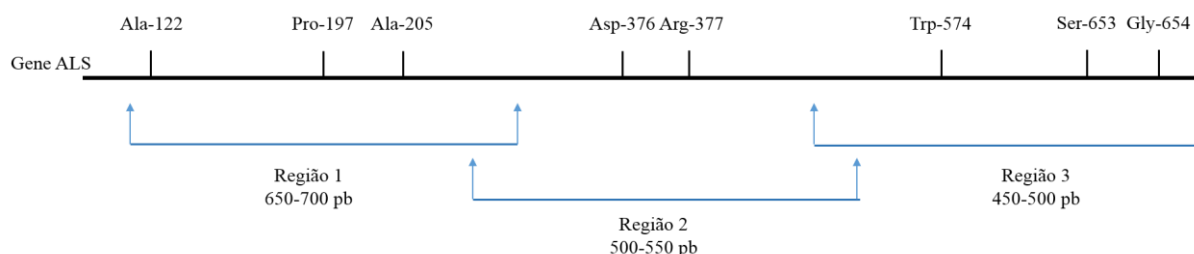


Figura 6. Esquema representativo do gene ALS (em preto) com as posições de aminoácidos onde já foram detectadas mutações para resistência a inibidores da ALS e regiões esperadas de amplificação (em azul) dos primers utilizados nas reações de PCR.

Amplificação do gene ALS em PCR (Reação de Polimerase em Cadeia)

Foram realizadas duas PCR separadamente, uma para as regiões 1 e 2 e outra para região 3, devido às diferentes temperaturas de anelamento para cada *primer*. A PCR foi realizada com volume final de 30 μL contendo 3,0 μL de tampão PCR *buffer*, 0,2 μL de Platinum Taq DNA polimerase, 2,4 μL de MgCl_2 , 1,2 μL de dNTPs, 1,2 μL de primers (0,6 μL F + 0,6 μL R) a 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 3,75 μL de DNA a 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ e 18,15 μL de H_2O miliQ. O protocolo de amplificação em termociclador consistiu em 10 min de incubação a 95°C, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 1 min para o anelamento a 62°C (região 1 e 2) e 60°C (região 3), 30 seg a 72°C e ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Para verificar a qualidade do produto amplificado (5,0 μL de cada amostra) foram colocados em gel de agarose a 1,7%, coradas com brometo de etídio (3%) e submetidos a eletroforese para a observação das bandas em luz UV.

Sequenciamento

Após verificar as bandas em gel de agarose, 25 μL dos produtos das amplificações foram enviadas para BPI Biotecnologia (Botucatu – SP). Os amplicons foram submetidos à etapa de purificação utilizando Bead Magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) para remoção de fragmentos muito pequenos e restos de primers, de acordo com protocolo do fabricante. As amostras foram submetidas à reação de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. O sequenciamento automático por eletroforese capilar foi realizado no equipamento ABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados foram analisados em eletroferogramas pelo programa Chromas para obtenção da sequência consenso (F e R). As sequências foram comparadas com outras já cadastradas no banco de dados do Nacional Center for Biotechnology Informatino (NCBI) por meio do BLASTn. Os produtos do sequenciamento foram alinhados com utilizando o software BioEdit. As sequências de aminoácidos das populações SUS, R1, R2, R3 e *Arabidopsis thaliana* (Gene Bank: X51514) foram alinhadas para a identificação de mutações. As regiões de interesse (resíduos 122, 197, 205, 376, 377, 574, 653 e 654) foram verificadas em três plantas de cada população.

Segunda etapa - aplicação de inibidores da ALS e inibidores da P450:

Sementes da geração F1 das populações SUS, R1 e R2 foram semeadas em bandejas e transplantadas para vasos exatamente como realizado na primeira etapa deste trabalho. Os vasos

foram preenchidos com solo peneirado com as seguintes características: teor de argila de 21%, teor de areia de 68%, 2,1% de M.O., CTC de 9,8 mg dm⁻³, pH_{H₂O} de 6,4. Manteve-se uma planta por vaso, as quais foram acomodadas em casa de vegetação no Centro Técnico de Irrigação da Universidade Estadual de Maringá, sob irrigação por aspersão entre 3 e 5 mm dia⁻¹.

Foram realizados três experimentos, um para cada população resistente (R1 e R2) e um para suscetível (SUS). A população R3 não foi utilizada pois não havia quantidade de sementes suficiente para a realização dos ensaios. Os experimentos consistiram em aplicações de inibidores da ALS (imazethapyr, chlorimuron e diclosulam) com ou sem a aplicação de dois inibidores de P450 (malathion e PBO). Como o herbicida diclosulam é letal para a população R1 (capítulos 1 e 2), tratamentos adicionais com subdoses foram adicionados (tratamentos 10, 11 e 12). Os detalhes dos tratamentos estão descritos na Tabela 12. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições. As aplicações de malathion e PBO ocorreram uma hora antes das aplicações dos herbicidas nos tratamentos que continham a associação de inibidores da P450 e inibidores da ALS (MA et al., 2013).

Tabela 12. Tratamentos e doses aplicados nos experimentos em duas populações de *Bidens subalternans* resistentes a inibidores da ALS.

Tratamento	Aplicação A		Aplicação B	
	Molécula	Dose (g i.a. ha ⁻¹)	Molécula	Dose (g i.a. ha ⁻¹)
1	-	-	imazethapyr	106
2	malathion	1000	imazethapyr	106
3	PBO ^{1/}	1200	imazethapyr	106
4	-	-	chlorimuron ^{2/}	20
5	malathion	1000	chlorimuron ^{2/}	20
6	PBO ^{1/}	1200	chlorimuron ^{2/}	20
7	-	-	diclosulam ^{2/}	26
8	malathion	1000	diclosulam ^{2/}	26
9	PBO ^{1/}	1200	diclosulam ^{2/}	26
10	-	-	diclosulam ^{2/}	8
11	malathion	1000	diclosulam ^{2/}	8
12	PBO ^{1/}	1200	diclosulam ^{2/}	8
13	malathion	1000	-	-
14	PBO ^{1/}	1200	-	-
15	Testemunha	-	-	-

^{1/}Diluído em óleo mineral Assist a 0,5% v v⁻¹; ^{2/}Adicionado óleo mineral Assist a 0,5% v v⁻¹. Aplicação B ocorreu 1 h após a aplicação A. PBO: butóxido de piperonila.

Todas as aplicações ocorreram com pulverizador costal pressurizado por CO₂, com volume de calda de 200 L ha⁻¹, a uma velocidade de 1,0 m s⁻¹ e com pressão de 30 PSI. As três pontas de pulverização que compuseram a barra de aplicação foram do modelo XR 110.02 espaçadas 0,5 m entre si. A barra de aplicação foi posicionada a 0,5 m acima das plantas.

Foram realizadas avaliações visuais de controle aos 21 dias após a aplicação (DAA), atribuindo notas de 0-100%, em que zero significa ausência de sintomas e 100% a morte da planta. Aos 21 DAA, as plantas foram cortadas rente ao solo e levadas para estufa a 62°C para secagem e obtenção da massa seca.

Para analisar os dados, foi realizado a análise de variância e teste F a 5% de probabilidade e também comparação entre médias pelo teste de *t*-student (LSD), a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeira etapa: sequenciamento do gene ALS

Na região 1 do gene ALS, os amplicons geraram uma sequência de 664 a 692 pb e apresentaram 81% de similaridade com gene ALS de *Helianthus annuus* (Gene Bank: AY541452.1). Não foram observadas mutações para a sequência que codifica para o aminoácido Pro-197 em nenhuma população. Na posição da Ala-205, houve substituição de GCC por CCC, que configura a substituição de Ala por Gln (Figura 7). Porém, essa substituição foi observada em populações diferentes e até mesmo em amostras da população SUS. Além do fato de não haver registro da mutação Ala-205-Gln para outras espécies de plantas daninhas, ao observar o eletroferograma das amostras que continham a substituição, observou-se sobreposição de picos que configuram nucleotídeos C e G (Figura 8). Portanto, é provável que a substituição não esteja envolvida nas causas da resistência, mas sim que sejam consequência de erros no sequenciamento.



Figura 7. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene ALS de quatro populações de *B. subalternans* resistentes a inibidores da ALS.

*substituição de Ala-205-Gln causada por sobreposição de picos na leitura do sequenciamento

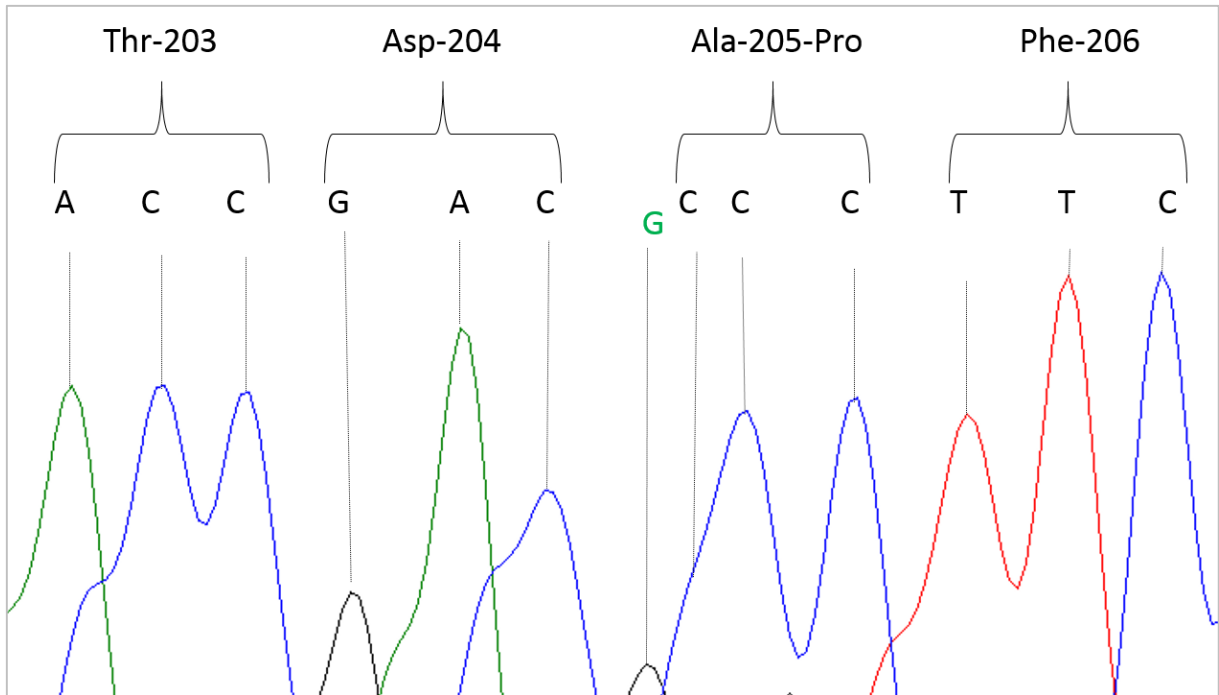


Figura 8. Eletroferograma do sequenciamento da região 1 do gene ALS de uma amostra da população Sus de *Bidens subalternans*.

O nucleotídeo CCC na posição 205 foi lido equivocadamente e substituído pelo nucleotídeo GCC (em verde) que deveria compor a sequência. A substituição resultou na troca de Ala-205-Pro que não configura resistência a inibidores da ALS

Na região 2, que resultou em sequenciamento de 525 a 543 pb, houve similaridade de 84% com o gene ALS de *Herrania umbricata* (Gene Bank XM021435659.1). O sequenciamento não revelou mutações nas regiões esperadas (Asp-376 e Arg-377) em nenhuma das populações resistentes (Figura 2).

A região 3 sequenciada demonstrou 99% de similaridade com o gene ALS de *Bidens pilosa* (Gene Bank AJ514936.1) e 94% e 95% de similaridade com as sequências de nucleotídeos determinadas por Lamego et al. (2009) em *Bidens subalternans*. As sequências resultaram entre 550 e 588 pb entre as amostras avaliadas. Ao observar a posição Trp-547, não foram constatadas substituições de nucleotídeos em nenhuma amostra (Figura 7). Portanto, mutações nesta posição do gene ALS não são os motivos da resistência das três populações avaliadas.

Bidens subalternans é uma espécie tetraploide (LAMEGO et al., 2009), portanto as mutações podem ser homozigotas ou heterozigotas. Como não foram observados sobreposição dos picos no eletroferograma, assume-se que as sequências observadas são homozigotas nas posições avaliadas.

As mutações mais frequentes que causam resistência a inibidores da ALS ocorrem na Pro-197 e Trp-547, e estas mutações já foram descritas em elevado número de espécies

(TRANEL et al., 2018). Em *Rapristum rugosum* a mutação Pro-197-Ser confere resistência a todos os grupos químicos que inibem a ALS, exceto para imidazolinonas (HATAMI et al., 2016). Em *Eclipta prostrata* esta mesma substituição causa resistência a todos os grupos de inibidores da ALS (LI et al., 2017). Ao avaliar várias populações de *Descurainia sophia*, verificou-se que podem ocorrer as mutações Pro-197 por Ser, Thr, Leu, His e Tyr (DENG et al., 2015). Para o caso da substituição na Trp-547-Ser, esta mutação proporciona resistência a todos os grupos químicos dos inibidores da ALS na maioria das situações, como já foi identificado em *Raphanus sativus* (PANDOLFO et al., 2016), *Cyperus iria* (RIAR et al., 2015) e inclusive em *B. subalternans* (LAMEGO et al., 2009). Ainda podem ocorrer substituições da Trp-547 por Arg ou Met (HAMOUZOVÁ et al., 2013; LI et al., 2017).

Outras posições do gene ALS estão sujeitas a mutações pontuais como Asp-376-Glu que ocorre em *Amaranthus retroflexus* (HUANG et al., 2016) ou Ala-205-phe em *Poa annua* (BROSNAN et al., 2016). Todas as mutações podem ser verificadas no banco de dados em “Mutations in herbicides-resistant weed to ALS inhibitors” (TRANEL et al., 2018).

Existe também a possibilidade de uma mesma espécie apresentar mais de uma mutação que confere resistência a inibidores da ALS, como por exemplo, *Conyza canadensis* que pode apresentar as mutações Asp-376-Glu, Pro-197-Ala ou Pro-197-Ser (ZENGEH et al., 2011) e *Poa annua* que pode apresentar Ala-205-Phe e Trp-574-Leu (BROSNAN et al., 2016).

Os padrões de resistência cruzada diferenciados entre populações oriundas das mutações ocorridas no gene ALS nem sempre constituem uma regra, pois pode haver variações na resposta para diferentes espécies. Por exemplo, a Ala-122-Thr confere resistência a imidazolinonas (IMI's) mas não a sulfonilureias (SUL's) e triazolopirimidinas (TRI's), característica semelhante ao que ocorre com a população R1. Entretanto, esta mesma substituição pode gerar elevados fatores de resistência para os três grupos (YU e POWLES, 2015), como ocorre com a população R2.

Três posições do gene ALS não foram analisadas no presente trabalho, sendo elas Ala-122, Ser-653 e Gly-654. Como estas posições estão presentes no início (122) e no final (653 e 654) do gene, é possível que os *primers* (região 1 e região 3) se anelaram muito próximos a estas posições, o que prejudicou a leitura pelo sequenciador. Estas posições não são as mais frequentes mas também são importantes causadoras de resistência a inibidores da ALS em várias plantas daninhas como *Raphanus sativus* – Ala-122-Tyr (HAN et al., 2012) e *Amaranthus palmeri* – Ser-653-Asn (BERGER et al., 2016). É necessário, portanto, realizar mais trabalhos para sequenciar as regiões que abrangem os resíduos 122, 653 e 654 do gene

ALS em *Bidens subalternans*, visando esclarecer se tais regiões apresentam mutações que possam estar envolvidas na resistência aos inibidores da ALS.

Segunda etapa - aplicação de inibidores da ALS e inibidores da P450:

Para a população SUS, não foram observadas diferenças entre a aplicação dos herbicidas isolados e associados a malathion e PBO. Em contrapartida, para as populações resistentes foram encontradas algumas diferenças. Na R1, o diclosulam (8 g ha^{-1}) aplicado em plantas tratadas com malathion apresentou 23,8% a mais de controle em relação ao tratamento com apenas diclosulam. Para a associação com PBO, esta diferença foi ainda maior, em que o controle aumentou em 37,5% (Tabela 13). O diclosulam é considerado eficiente para o controle da população R1 (Capítulos 1 e 2). Apesar da suscetibilidade desta população ao diclosulam, é possível que as enzimas P450 atuem na metabolização do herbicida, fazendo com que o efeito de sinergismo entre malathion e PBO fique mais perceptível quando doses mais baixas do herbicida são aplicadas. Para os demais produtos, imazethapyr e chlorimuron, não foram observados efeitos de melhora no controle quando eles foram aplicados associados a malathion e PBO.

Tabela 13. Níveis de controle (%) e massa seca da parte aérea em relação a testemunha (%) em três populações de *Bidens subalternans* resistentes a inibidores da ALS tratadas ou não com inibidores da P450 (malathion e butóxido de piperonila - PBO).

Tratamento ^{1/}	Dose	Exp. 1 População SUS				Exp. 2. População R1				Exp. 3. População R2			
		% controle		% massa rel. test.		% controle		% massa rel. test.		% controle		% massa rel. test.	
1 Imazethapyr	106	63,8	b	28,8	def	48,8	c	88,3	ab	0,0	e	85,4	abcd
2 imazethapyr + malathion	106 + 1000	56,8	c	41,3	cd	48,0	c	84,6	abc	0,0	e	87,7	abc
3 imazethapyr + PBO	106 + 1200	59,3	bc	32,1	de	51,3	c	79,1	abc	0,0	e	88,9	ab
4 chlorimuron	20	97,0	a	3,3	ef	55,0	c	53,5	abcde	21,3	c	59,1	de
5 chlorimuron + malathion	20 + 1000	98,5	a	2,0	ef	55,0	c	56,0	abcd	30,0	b	52,6	ef
6 chlorimuron + PBO	20 + 1200	99,5	a	0,3	f	56,3	c	38,2	cdef	41,3	a	30,3	f
7 diclosulam	26	100,0	a	1,5	f	88,0	ab	17,5	def	1,3	de	87,2	abcd
8 diclosulam + malathion	26 + 1000	98,5	a	5,4	def	96,5	a	7,1	ef	3,8	de	74,7	abcde
9 diclosulam + PBO	26 + 1200	99,8	a	1,0	f	96,3	a	1,8	f	7,5	d	86,5	abcd
10 diclosulam	8	98,5	a	2,6	ef	52,5	c	42,5	bcdef	2,5	de	71,5	bcde
11 diclosulam + malathion	8 + 1000	99,5	a	0,8	f	76,3	b	14,8	def	3,8	de	77,0	abcde
12 diclosulam + PBO	8 + 1200	96,8	a	13,3	f	90,0	ab	8,0	ef	3,8	de	59,4	cde
13 malathion	1000	0,0	d	76,5	ab	0,0	d	83,7	abc	1,3	de	86,0	abcd
14 PBO	1200	0,0	d	59,9	bc	0,0	d	92,9	a	1,3	de	76,5	abcde
15 Testemunha	-	0,0	d	100,0	a	0,0	d	100,0	a	0,0	e	100,0	a
F		354,6		11,28		45,9		4,6		27,45		3,26	
DMS		6,05		26,98		13,92		46,84		6,87		28,29	

“+” indica aplicação com intervalo de 1 h. PBO: butóxido de piperonila. Letras seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste de *t*-student (LSD).

Um pequeno efeito aditivo no controle da população R2 também foi observado para o herbicida chlorimuron. Aplicado em plantas tratadas com malathion e PBO, este herbicida proporcionou, respectivamente, 8,6% e 20% a mais de controle em relação ao tratamento com apenas a aplicação de chlorimuron (Tabela 13). Assim como na população R1, o efeito foi observado para o herbicida que apresenta os maiores níveis de controle dentre os avaliados.

Este tipo de efeito também já foi verificado em plantas de *Amaranthus tuberculatus* resistentes a imazethapyr e chlorimuron, para os quais a adição de malathion reduziu o crescimento das plantas que já apresentavam níveis intermediários de injúria pelos inibidores da ALS (GUO et al., 2015). Em *Bromus rigidus* resistentes a sulfosulfuron, as plantas passaram a ser sensíveis quando foram tratadas com malathion, além de não terem sido verificadas mutações no gene ALS, indicando que a metabolização do herbicida via P450 foi o provável mecanismo de resistência (OWEN et al., 2012). Em contrapartida, a aplicação de malathion ou PBO, seguida de iodosulfuron ou imazethapyr não influenciou nos níveis de controle em biótipos de *Raphanus sativus* resistentes. Neste caso, o mecanismo responsável pela resistência foi a mutação Trp-574 (CECHIN et al., 2017).

As citocromos P450 monoxigenases catalisam uma gama de reações de hidroxilação e oxidação que podem ocorrer com herbicidas. Em populações com maior atividade destas enzimas, é possível que a expressão de genes que codificam as P450 seja maior, o que leva a um aumento da capacidade de metabolização de compostos secundários (DÉLYE et al., 2012). Em *Echinochloa phyllopogon* ocorre o aumento da expressão de sete genes que transcrevem enzimas P450 em biótipos resistentes a bispyribac, após 12 h do tratamento com o herbicida (IWALKAMI et al., 2014).

A metabolização dos compostos pode ser importante no que diz respeito à resistência múltipla, pois a capacidade de degradação das moléculas pode ocorrer para dois ou mais herbicidas de grupos químicos ou de mecanismos de ação distintos. Ma et al. (2013) verificaram que plantas de *Amaranthus tuberculatus* resistentes a inibidores da síntese de carotenoides por metabolização também demonstraram resistência a inibidores da ALS, que nunca haviam sido utilizados para o controle destas populações.

Verificando os metabólitos de metsulfuron em cromatografia, Hatami et al. (2016) observaram que este herbicida recebe uma hidroxila ou se conjuga com carboidratos em *R. rugosum*, anulando o efeito tóxico do metsulfuron. Os autores discutem que este pode ser resultado de elevada atividade das enzimas P450, entretanto, no mesmo biótipo, também foi verificada a mutação Pro-197-Ser como um dos mecanismos de resistência.

Nos biótipos de *Bidens subalternans* avaliados, há indícios de que a resistência também pode ser causada pela metabolização dos inibidores da ALS pelas enzimas P450, entretanto a diferença observada no controle ainda é pequena quando comparada com outros trabalhos (MA et al., 2013; GUO et al., 2015). Processos de metabolização de herbicidas com enzimas destoxicadoras como as P450 podem ocorrer com mais frequência do que pode ser observado no campo. São, geralmente, biótipos com menores níveis de resistência, como por exemplo a população R1, e por isso são difíceis de serem identificados em relação àqueles biótipos resistentes por mutações, os quais são facilmente observados no campo. Todavia, o sinergismo entre herbicidas e organofosforados (malathion e PBO) foi significativo em apenas um herbicida para cada população, o que sugere que este não é o único mecanismo envolvido na resistência destas populações. Como o sequenciamento do gene ALS dos biótipos resistentes não permitiu a análise de toda a cadeia nucleotídica, é possível ainda que haja resistência, tanto por metabolização, quanto por mutações pontuais.

Os mecanismos de resistência apresentam complexidade e podem variar de acordo com a espécie ou mesmo entre populações da mesma espécie e com a intensidade e frequência de uso dos diferentes herbicidas em cada área. É possível ainda ocorrer mais de um mecanismo de resistência em uma mesma população.

CONCLUSÕES

Não existem mutações nos resíduos 197, 205, 376, 377 e 574 das populações avaliadas (R1, R2 e R3), demonstrando que estas não são regiões do gene responsáveis por causar diferentes níveis de resistência entre populações de *Bidens subalternans*. O sinergismo entre inibidores da P450 e dos herbicidas inibidores da ALS é um indício de que ocorre a metabolização dos herbicidas pelas enzimas detoxificantes, o que contribui para a resistência nas populações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- BECKIE, H.J.; TARDIF, F.J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v.35, n.1, p.15-28, 2012.
- BERGER, S.; MADEIRA, P.T.; FERREL, J.; GETTYS, L.; MORICHETTI, S.; CANTERO, J.J.; NUÑEZ, C. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identification and documentation of ALS-resistance in Argentina. **Weed Science**, v.64, n.2, p.312-320, 2016.
- BROSNAN, J.T.; VARGAS, J.J.; BREEDEN, G.K.; GRIER, L.; APONTE, R.A.; TRESCH, S.; LAFOREST, M. A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Planta**, v.243, n.1, p.149-159, 2016.
- BUSI, R.; GAINES, T.A.; POWLES, S. Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Pest Management Science**, v.73, n.2, p.410-417, 2016.
- CECHIN, J.; VARGAS, L.; AGOSTINETTO, D.; LAMEGO, F.P.; MARIANI, F.; DAL MAGRO, T. Mutation of Trp-574-Leu ALS gene confers resistance of radish biotypes to iodosulfuron and imazethapyr herbicides. **Acta Scientiarum**, v.39, n.3, p.299-306, 2017.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.513-518, 2002.
- DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-bases resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v.69, n.2, p.176-187, 2012.
- DÉLYE, C.; CAUSSE, R.; GAUTIER, V.; PONCET, C.; MICHEL, S. Using next-generation sequencing to detect mutations endowing resistance to pesticides: application to acetolactate-synthase (ALS)-based resistance in barnyard grass, a polyploidy grass weed. **Pest Management Science**, v.71, n.5, p.675-685, 2015.
- DENG, W.; LIU, M.J.; MEI, Y.; LI, X.F.; ZHENG, M.Q. Tribenuron-methyl resistance and mutataion diversity of Pro197 in flixweed (*Descurainia sophia* L.) accessions from China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.117, n.1, p.68-74, 2015.
- GUO, J.; RIGGINS, W.; HAUSMAN, N.E.; HAGER, A.G.; RIECHERS, D.E.; DAVIS, A.S.; TRANEL, P.J. Nontarget-site resistance to ALS inhibitors in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v.63, n.2, p.399-407, 2015.
- HAMOUCOVÁ, K.; KOSNAROVÁ, P.; SALAVA, J.; SOUKUP, J.; HAMOUZ, P. Mechanisms of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. **Pest Management Science**, v.70, n.4, p.541-548, 2013.

HAN, H.; YU, Q.; PURBA, E.; LI, M.; WALSH, M.; FRIESEN, S.; POWLES, S.B. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v.68, n.8, p.1164-1170, 2012.

HATAMI, Z.M.; GHEREKHLOO, J.; ROJANO-DELGADO, A.M.; OSUNA, M.D.; ALCÁNTARA, R.; FERNÁNDEZ, P.; SADEGHIPOUR, H.R.; PRADO, R. Multiple mechanisms increase levels of resistance in *Rapistrum rugosum* to ALS herbicides. **Frontiers in Plant Science**, v.169, n.7, p.1-13, 2016.

HUANG, Z.; CHEN, J.; ZHANG, C.; HUANG, H.; WEI, S.; ZHOU, X.; CHEN, J.; WANG, X. Target-site basis for resistance to imazethapyr in redroot amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.128, v.1, p.10-15, 2016.

IWAKAMI, S.; UCHINO, A.; KATAOKA, Y.; SHIBAIKE, H.; WATANABE, H.; INAMURA, T. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*, v. **Pest Management Science**, 70, n.4, p.549-558, 2014.

LAMEGO, F.P.; CHARLSON, D.; DELATORRE, C.A.; BURGOS, N.R.; VIDAL, A.R. Molecular basis of resistance to ALS-inhibitor herbicides in greater beggarticks. **Weed Science**, v.57, n.1, p.474-481, 2009.

LI, D.; LI, X.; YU, H.; WANG, J.; CUI, H. Cross-resistance of eclipta (*Eclipta prostrata*) in China to ALS inhibitors due to a Pro-197-Ser point mutation. **Weed Science**, v.65, n.5, p.547-556, 2017.

MA, R.; KAUNDUN, S.S.; TRANEL, P.J.; RIGGINS, C.W.; MCGINNES, D.L.; HAGER, A.G.; HAWKES, T.; MCINDOE, E.; RIECHERS, D.E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. **Plant Physiology**, v.163, n.1, p.363-377, 2013.

MCELROR, J.S.; FLESSNER, M.L.; WANG, Z.; DANE, F.; WALKER, R.H.; WEHTJE, G.R. A Trp₅₇₄ to Leu amino acid substitution in the ALS gene of annual bluegrass (*Poa annua*) is associated with resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v.61, n.1 p.21-25, 2013.

OWEN, M.J.; GOGGIN, D.E.; POWLES, S. Non-target-site-based resistance to ALS-inhibiting herbicides in six *Bromus rigidus* populations from western Australian cropping fields. **Pest Management Science**, v.68, n.7, p.1077-1082, 2012.

PANDOLFO, C.E.; PRESOTTO, A.; MORENO, F.; DOSSOU, I.; MIGASSO, J.P.; SAKIMA, E.; CANTAMUTTO, M. Broad resistance to acetohydroxyacid-synthase-inhibiting herbicides in feral radish (*Raphanus sativus* L.) populations from Argentina, **Pest Management Science**, v.72, n.2, p.354-361, 2016.

RIAR, D.S.; TEHRANCHIAN, P.; NORSWORTHY, J.K.; NANDULA, V.; MCELORY, S.; SIVASTAVA, V.; CHEN, S.; BOND, J.A.; SCOTT, R.C. Acelolactate synthase-inhibiting, herbicide-resistant rice flatsedge (*Cyperus iria*): cross-resistance and molecular mechanism of resistance. **Weed Science**, v.63, n.4, p.748-757, 2015.

SONG, J.; LIM, S.; YOON, M.; KIM, J.; KIM, D. Cross-resistance of *Echinochloa* species to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Weed Biology and Management**, v.17, n.2, p.91-102, 2017.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R.; HEAP, I.M. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Disponível em: <http://weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>, acesso em 22 jan 2018.

YASUOR, H.; OSUNA, M.D.; ORTIZ, A.; SALDAIN, N.E.; ECKERT, J.W.; FISCHER, A.J. Mechanism of resistance to penoxulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.5653-5660, 2009.

YU, Q.; POWLES, S.B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p.1340-1350, 2015.

YUN, M.; YOGO, Y.; MIURA, R.; YAMASUE, Y.; FISCHER, A.J. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.85, n.2 p.107-114, 2005.

ZHENG, D.; KRUGER, G.R.; SINGH, S.; DAVIS, V.M.; TRANEL, P.J.; WELLER, S.C.; JOHNSON, W.G. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest Management Science**, v.67, n.2, p.1486-1492, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

Concluiu-se que ocorre diferença na resposta a diferentes inibidores da ALS em populações de picão-preto (*Bidens subalternans*) resistentes, dentre os quatro grupos químicos (imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas e pirimidinil-benzoatos) e também entre herbicidas de mesmo grupo. Nas populações avaliadas, a resistência ocorre em aplicações em pré e em pós-emergência. O fato de não haver diferenças consistentes entre aplicações em pré e pós-emergência é um indicativo de que provavelmente, os mecanismos de resistência estão mais relacionados com mutações do que com *non target site*.

Neste trabalho, conclui-se que para picão-preto (*Bidens subalternans*), quando existe resistência a inibidores da ALS, não necessariamente ocorre resistência ampla, em outras palavras, nem sempre existe resistência a todos os herbicidas de todos os grupos. Foi comprovado que, dependendo da população pode haver resistência apenas a imazethapyr e chlorimuron, mas não a diclosulam (população R1), a imazethapyr, chlorimuron e diclosulam (população R2) e apenas a imazethapyr, mas não a chlorimuron e diclosulam (população R3).

Comprovou-se que a mutação Trp-547-Leu, como já identificado em biótipos de *B. subalternans* no Brasil, não foi o mecanismo de resistência das populações aqui avaliadas, indicando que outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência desta espécie a inibidores da ALS. As mutações na Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377 também não foram encontradas nas populações com diferentes padrões de resistência cruzada.

Houve pequeno efeito sinérgico entre as aplicações dos inibidores da ALS e inibidores da P450 (malathion e butóxido de piperonila), o que sugere que a resistência a chlorimuron e diclosulam esteja relacionada com a maior atividade das enzimas citocromo P450 monoxigenases nas populações R1 e R2, respectivamente.

**ANEXO I. RESUMO DE ANÁLISES DE VARIÂNCIA PARA OS
EXPERIMENTOS DO CAPÍTULO 1**

Tabela 14. Resumo da análise de variância e desdobramentos para o experimento em pós-emergência (Capítulo 1).

FV	% controle			% massa em rel. a test.		
	GL	QM		GL	QM	
Herbicida	17	7166,900588	*	17	8655,125	*
População	3	81432,63667	*	3	56382	*
Herbicida*população	51	1695,092157	*	51	17278,99	*
Desdobramento herbicidas/populações						
Herbicida/população Sus	17	2191,114118	*	17	2193,561	*
Herbicida/população R1	17	4464,435294	*	17	4249,444	*
Herbicida/população R2	17	3164,418235	*	17	4531,987	*
Herbicida/população R3	17	2432,209412	*	17	2864,166	*
Desdobramento populações/herbicidas						
População /herbicida 1	3	4990,226667	*	3	4743,35	*
População /herbicida 2	3	5444,226667	*	3	2632,847	*
População /herbicida 3	3	8655,893333	*	3	9263,37	*
População /herbicida 4	3	9362,5	*	3	11093,97	*
População /herbicida 5	3	2839,726667	*	3	2446,153	*
População /herbicida 6	3	2409,083333	*	3	1706,63	*
População /herbicida 7	3	8551,56	*	3	6834,86	*
População /herbicida 8	3	8220,56	*	3	4853,597	*
População /herbicida 9	3	9876,393333	*	3	6836,527	*
População /herbicida 10	3	8313,893333	*	3	5667,663	*
População /herbicida 11	3	1777,06	*	3	831,7667	*
População /herbicida 12	3	1866,916667	*	3	555,08	*
População /herbicida 13	3	8408,333333	*	3	4560,213	*
População /herbicida 14	3	6675	*	3	2553,28	*
População /herbicida 15	3	12000,25	*	3	13673,31	*
População /herbicida 16	3	11190,893333	*	3	7505,987	*
População /herbicida 17	3	0	ns	3	0	ns
População /herbicida 18	3	0	ns	3	0	ns
Resíduo	216	59,66203704		216	793,418	
Total	287	1621,853449		287	2006,24	

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

Tabela 15. Resumo da análise de variância e desdobramentos para o experimento em pré-emergência (Capítulo 1).

FV	% controle			% massa em rel. a test.		
	GL	QM		GL	QM	
Herbicida	17	7942,542353	*	17	8597,333	*
População	3	52844,01	*	3	109116,9	*
Herbicida*população	51	1678,36549	*	51	4766,436	*
Desdobramento herbicidas/populações						
Herbicida/população Sus	17	2376,003529	*	17	2173,212	*
Herbicida/população R1	17	5971,866471	*	17	11076,75	*
Herbicida/população R2	17	2544,176471	*	17	7504,919	*
Herbicida/população R3	17	2085,591765	*	17	2141,759	*
Desdobramento populações/herbicidas						
População /herbicida 1	3	1816,416667	*	3	2632,28	*
População /herbicida 2	3	5605,5	*	3	10390,75	*
População /herbicida 3	3	3324,393333	*	3	4285,253	*
População /herbicida 4	3	1995,666667	*	3	7377,32	*
População /herbicida 5	3	8282,226667	*	3	24982,11	*
População /herbicida 6	3	5035,083333	*	3	8601,11	*
População /herbicida 7	3	6720,56	*	3	12959,11	*
População /herbicida 8	3	6790,56	*	3	7391,973	*
População /herbicida 9	3	5441,393333	*	3	6260,747	*
População /herbicida 10	3	2759,416667	*	3	2562,957	*
População /herbicida 11	3	5691,726667	*	3	6686,94	*
População /herbicida 12	3	4262,893333	*	3	8404,207	*
População /herbicida 13	3	6450,416667	*	3	26483,67	*
População /herbicida 14	3	4378,166667	*	3	17967,34	*
População /herbicida 15	3	6325,06	*	3	16141,18	*
População /herbicida 16	3	6496,726667	*	3	27019,3	*
População /herbicida 17	3	0	ns	3	0	ns
População /herbicida 18	3	0	ns	3	0	ns
Resíduo	216	145,1678241		216	1360,92	
Total	287	1430,342021		287	3524,908	

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

**ANEXO II. QUADROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS
EXPERIMENTOS DO CAPÍTULO 2.**

Tabela 16. Resumo da análise de variância e desdobramento para o experimento de dose resposta com o herbicida imazethapyr (Capítulo 2).

FV	% de controle			% massa em rel. a test.		
	GL	QM		GL	QM	
Dose	7	7033,891	*	7	7708,219	*
População	3	17959,96	*	3	6541,943	*
População vs dose	21	749,9181	*	21	347,01	ns
Dose/poulação Sus	7	4073,387	*	7	3310,107	*
Regressão	1	26006,07	*	1	23036,35	*
Desvios da regressão	6	417,94	*	6	22,4	*
Dose/população R1	7	2592,41	*	7	2223,651	*
Regressão	1	17152,3	*	1	12714,34	*
Desvios da regressão	6	165,7617	ns	6	475,2033	ns
Dose/população R2	7	68,63714	ns	7	1232,644	*
Regressão	1	459,18	*	1	8392,99	*
Desvios da regressão	6	3,546667	*	6	39,25333	*
Dose/população R3	7	2549,209	*	7	1982,843	*
Regressão	1	16375,95	*	1	12915,5	*
Desvios da regressão	6	244,7517	ns	6	160,7333	sn
Resíduo	96	96,61198		96	668,7467	
Total	127			127		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

Tabela 17. Resumo da análise de variância e desdobramento para o experimento de dose resposta com o herbicida chlorimuron (Capítulo 2).

FV	% de controle			% massa em rel. a test.		
	GL	QM		GL	QM	
Dose	7	13628,17	*	7	11551,42	*
População	3	20349,57	*	3	23066,56	*
População vs dose	21	1219,91	*	21	762,3686	ns
Dose/poulação Sus	7	4870,53	*	7	4733,053	*
Regressão	1	34046,84	*	1	33115,61	*
Desvios da regressão	6	7,811667	*	6	2,626667	*
Dose/população R1	7	4011,423	*	7	2105,581	*
Regressão	1	27059,27	*	1	12063,49	*
Desvios da regressão	6	170,115	ns	6	445,93	ns
Dose/população R2	7	4344,53	*	7	2703,676	*
Regressão	1	29623,56	*	1	15946,27	*
Desvios da regressão	6	131,3583	ns	6	496,5767	ns
Dose/população R3	7	4061,41	*	7	4296,219	*
Regressão	1	27368,72	*	1	27591,82	*
Desvios da regressão	6	176,8583	ns	6	413,6183	ns
Resíduo	96	92,36719		96	618,1455	
Total	127			127		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

Tabela 18. Resumo da análise de variância e desdobramento para a variável porcentagem de controle para o experimento de dose resposta com o herbicida chlorimuron (Capítulo 2).

FV	% de controle			% massa em rel. a test.		
	GL	QM		GL	QM	
Dose	7	10686,75	*	7	11882,22	*
população	3	47120,92	*	3	27661,28	*
População vs dose	21	1188,513	ns	21	1115,284	*
Dose/poulação Sus	7	4786,173	*	7	4855,804	*
Regressão	1	33377,81	*	1	23036,35	*
Desvios da regressão	6	20,9	*	6	1825,713	*
Dose/população R1	7	4840,387	*	7	5538,631	*
Regressão	1	32384,23	*	1	12714,34	*
Desvios da regressão	6	249,7467	ns	6	4342,68	*
Dose/população R2	7	42,74429	*	7	336,2071	*
Regressão	1	0,0003	ns	1	8392,99	*
Desvios da regressão	6	49,86828	*	6	-1006,59	ns
Dose/população R3	7	4582,981	*	7	4497,424	*
Regressão	1	31672,86	*	1	12915,5	*
Desvios da regressão	6	68,00167	ns	6	3094,412	*
Resíduo	96	24,8776		96	554,6744	
Total	127			127		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

Tabela 19. Resumo da análise de variância para o experimento screening em várias populações com o herbicida imazethapyr (Capítulo 2).

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Populações	36	210484,39	5846,79	55,29	0,00
Resíduo	111	11737,25	105,74		
Total	147	222221,64	1511,71		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio. Nível de probabilidade: 5% (alfa: 0,05).

Tabela 20. Resumo da análise de variância para o experimento screening em várias populações com o herbicida chlorimuron (Capítulo 2).

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Populações	36	155841,68	4328,94	33,99	0,00
Resíduo	111	14137,25	127,36		
Total	147	169978,00	1156,31		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio. Nível de probabilidade: 5% (alfa: 0,05).

Tabela 21. Resumo da análise de variância para o experimento screening em várias populações com o herbicida diclosulam (Capítulo 2).

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Populações	36	294425,67	8178,49	43,33	0,00
Erro	111	20949,00	188,73		
Total	147	315374,67	2145,41		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio. Nível de probabilidade: 5% (alfa: 0,05).

**ANEXO III. QUADROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS
EXPERIMENTOS DO CAPÍTULO 3**

Tabela 22. Resumo da análise de variância para o experimento com inibidores da P450 e inibidores da ALS na população SUS (Capítulo 3).

FV	% controle		*	% massa em rel. a test.		*
	GL	QM		GL	QM	
Tratamentos	14	6404,58	*	14	4052,131	*
Resíduo	45	18,06111		45	359,1184	
Total	59			59		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

Tabela 23. Resumo da análise de variância para o experimento com inibidores da P450 e inibidores da ALS na população R1 (Capítulo 3).

FV	% controle		*	% massa em rel. a test.		*
	GL	QM		GL	QM	
Tratamentos	14	4390,25	*	14	4980,746	*
Resíduo	45	95,63889		45	24,04156	
Total	59			59		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

Tabela 24. Resumo da análise de variância para o experimento com inibidores da P450 e inibidores da ALS na população R2 (Capítulo 3).

FV	% controle		*	% massa em rel. a test.		*
	GL	QM		GL	QM	
Tratamentos	14	640,595	*	14	1287,25	*
Resíduo	45	23,33333		45	394,84	
Total	59			59		

FV: Fonte de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo.

