



HRAC-BR

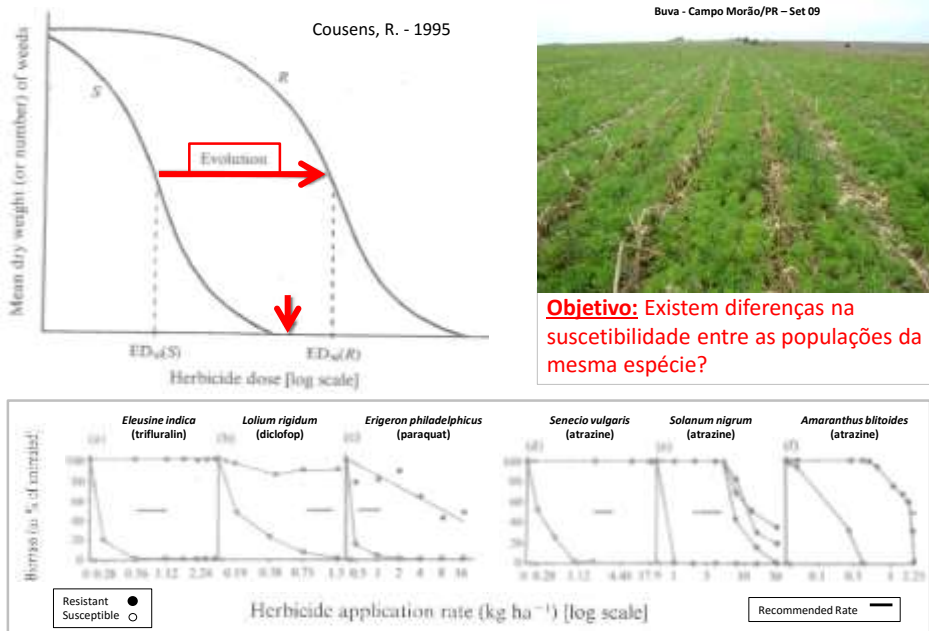


## Metodologias Científicas e Detecção de Plantas Daninhas Resistentes a Herbicidas

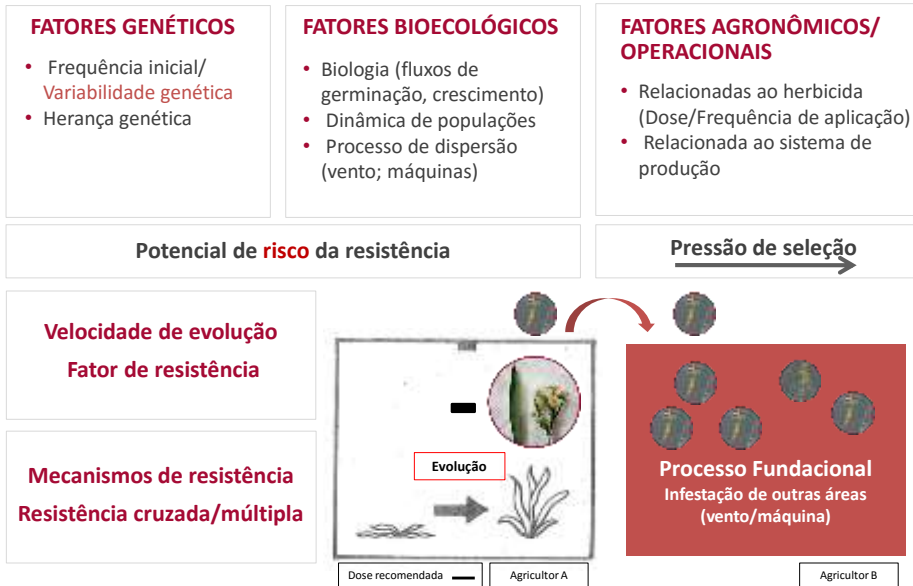
II Workshop HRAC-BR / XXVIII CBCPD  
Setembro, 03 / 2012  
Campo Grande, MS

Eng. Agr. Ramiro Lopez Ovejero  
Vice-Presidente HRAC-BR ([www.hrac-br.com.br](http://www.hrac-br.com.br))  
[ramiro.f.ovejero@monsanto.com](mailto:ramiro.f.ovejero@monsanto.com)

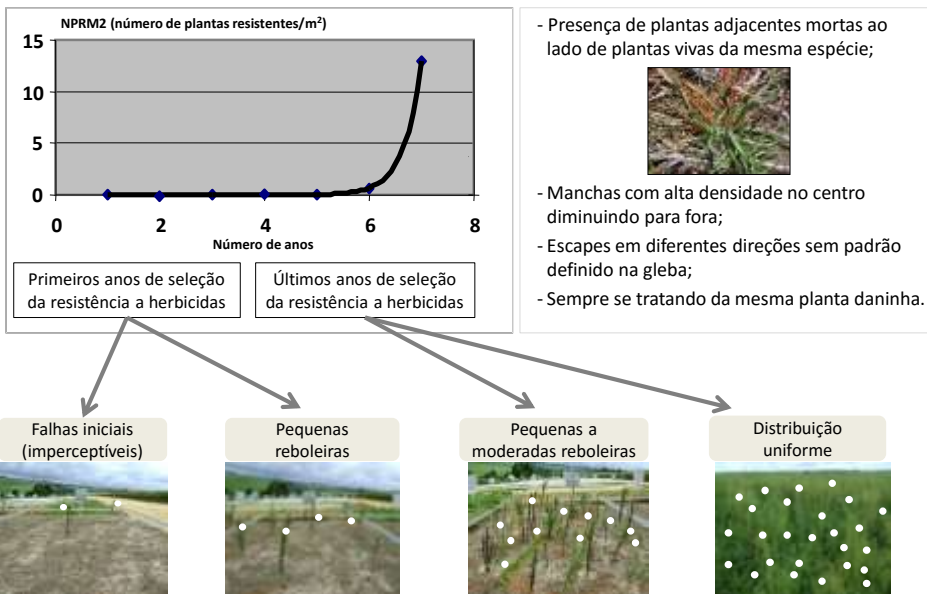
### A evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas



## Principais fatores que interferem na evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas

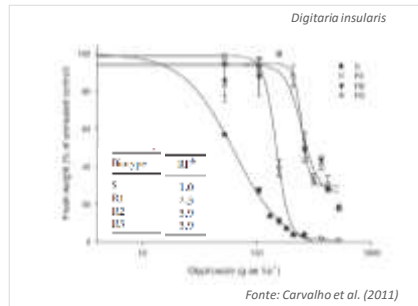
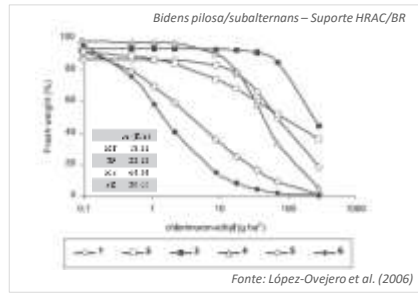


## Evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas



## Casos de resistência de plantas daninhas no Brasil

Espécie	MOAs	FR R/S
<i>Bidens pilosa</i> (picão-preto)	ALS	40 a 174 Christoffoleti et al (2002)
<i>Bidens subalternans</i> (picão-preto)	ALS	22 a 86 Gelmini et al (2002)
<i>Euphorbia heterophylla</i> (amendoim-bravo)	ALS	7 a 12/50 a 91/19 a 27 Gazziero et al. (1998) Vargas et al. (1999) Gelmini et al. (2001)
<i>Euphorbia heterophylla</i> (amendoim-bravo)	ALS/ PROTOX	15 a 24 /39 a 62 Trezzi et al. (2005) 1,4 a 2,1 Trezzi et al. (2009)
<i>Bracharia plantaginea</i> (capim-marmelada)	ACCCase	2,0 a 16/1,4 a 100 Gazziero et al. (2000) Christoffoleti (2001)
<i>Digitaria ciliaris</i> (capim-colchão)	ACCCase	5,5 a 33,0 López-Ovejero et al (2006)
<i>Eleusine indica</i> (capim-pé-de-galinha)	ACCCase	18,4 Vidal et al (2006)
<i>Cyniza spp</i> (Buva)	EPSPs	2,3/5,45/7 a 14 Lamego & Vidal (2008) Adegas et al., (2009) Moreira et al., (2007)
<i>Digitaria insularis</i> (capim-amargoso)	EPSPs	6,5/2 a 4/3,4 a 5,0 Nicolai et al., (2010); Carvalho, (2011) Melo (2011)
<i>Lolium multiflorum</i> (azevém)	EPSPs	3,0/16,8 Ribeiro (2008) Vargas et al. (2005)



## Casos de resistência de plantas daninhas no Brasil

Espécie	MOAs	Mecanismo	Fitness
<i>Bidens pilosa</i> (picão-preto)	ALS	Local de ação Monquero et al (2003)	Similar Christoffoleti (2001)
<i>Bidens subalternans</i> (picão-preto)	ALS	-	-
<i>Euphorbia heterophylla</i> (amendoim-bravo)	ALS	Local de ação Vargas et al. (1999)	Similar Vargas et al. (1999)
<i>Euphorbia heterophylla</i> (amendoim-bravo)	ALS/ PROTOX	Absorção do protox Trezzi et al. (2009)	Similar Trezzi et al. (2009)
<i>Bracharia plantaginea</i> (capim-marmelada)	ACCCase	Local de ação Cortez (2000)	-
<i>Digitaria ciliaris</i> (capim-colchão)	ACCCase	-	Similar López-Ovejero et al (2006)
<i>Eleusine indica</i> (capim-pé-de-galinha)	ACCCase	Local de ação Gouliart et al. (2006)	-
<i>Cyniza spp</i> (Buva)	EPSPs	Menor translocação Ferreira et al. (2008) Outros Cardinalli et al. (2010)	Menor Moreira (2007)
<i>Digitaria insularis</i> (capim-amargoso)	EPSPs	Menor translocação Carvalho (2011) Outros Carvalho (2011)	Menor (MS) Melo (2011)
<i>Lolium multiflorum</i> (azevém)	EPSPs	Menor translocação Ferreira et al. (2006) Outros Ribeiro (2008)	Menor Vargas et al. (2005)



**Alto nível de resistência/No local de ação**  
Plantas com poucos sintomas ou sem sintomas, com poucas plantas com respostas intermediárias. Plantas sensíveis podem estar presentes na população.



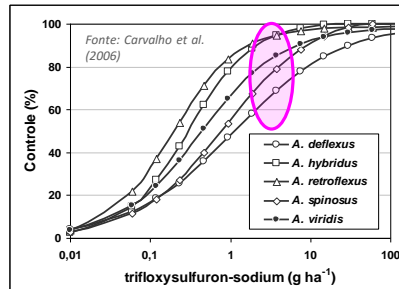
**Baixo nível de resistência/Fora do local de ação**  
Plantas com poucos sintomas a mortas, sendo que a maior parte delas exibem respostas intermediárias. Plantas suscetíveis estão presente na população (resistência detectada no início).

**CURVAS DOSE-RESPOSTA**

## Identificação da espécie de planta daninha



Planta herborizada: flores, folhas, frutos e sistema radicular.



Sensibilidade das diferentes espécies ao herbicida



Aquênios de  
(A) *Bidens pilosa*  
(B) *Bidens subalternans*  
- Picão-preto?  
(Suporte HRAC-BR)  
- *Conyza*?

- Resistência, Tolerância, plantas de difícil controle?
- Qual é a dose para cada espécie?
- Essas doses estão registradas no rótulo do produto?

## Procedimento de coleta de sementes para estudos

- **Coletar** de forma aleatória sementes em quantidade e qualidade adequadas das plantas oriundas de escapes/reboleiras (plantas que sobreviveram a aplicação do herbicida)
- **Qualidade:**
  - Sementes maduras (na sua maioria) – conforme espécie;
  - Após colheita beneficiar as semente e guardar em condições adequadas (longevidade, dormência etc.)
- **Quantidade:**
  - Coletar apenas sementes;
  - Espécies com elevada x baixa produção de sementes (pelo menos 1000 sementes);
  - Área: 100 x 50 m na reboleira.
- **Registrar** as informações e etiquetar devidamente as amostras coletadas;
- **Coleta do banco de sementes** – problemas devido a coleta dos biótipos suscetíveis e outras espécies.



Foto: Ovejero (2003)



*Digitaria insularis* (Glifosato)  
- Não coletar

*Digitaria insularis* (Glifosato)  
- Coletar



Fotos: Melo (2012)

## Populações de referência para realizar os estudos

### – Padrão Suscetível (S):

- Pelo menos duas populações reconhecidamente suscetíveis;
- Podem ser coletadas de áreas nunca tratadas com o herbicida ou comprar de empresas produtoras;
- A inclusão de populações S apropriadas é fundamental; as mesmas devem representar a variabilidade de todas as populações da mesma espécie;
- A variabilidade natural dentro das populações podem afetar os resultados.

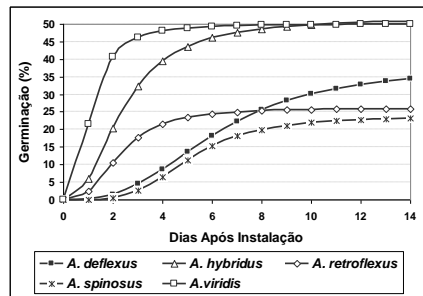
### – Padrão Resistente (R): Reconhecidamente resistente após varias gerações (consolidada).



## Entender a biologia da planta daninha



Sistema radicular de *D. insularis* aos 45 DAE.  
A – Visão Geral; B – Detalhe dos rizomas formados.



Germinação de cinco espécies de *Amaranthus* (8h – luz / 16h – escuro e 25°C). Piracicaba – SP, 2005. Carvalho (2006).

- Cada espécie tem suas necessidades específicas de crescimento e desenvolvimento (instalar os ensaios na melhor época);
- Assegurar que as parcelas contenham plantas vigorosas em quantidades mínimas e com o mesmo número por vaso;
- Irrigação adequada – subsuperfície ou automática por aspersão.

## Herbicidas e Doses

- **Doses:** é necessário alcançar 100% de controle para as suas populações R e S. Utilizar pelo menos 8 doses para cada população. Exemplo:

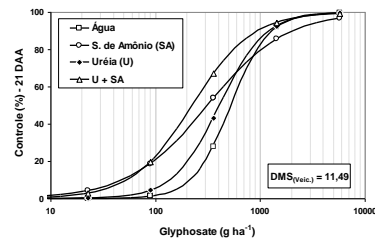
População S: 0; 1/16x; 1/4x; 1/2x; 1x; 2x; 4x; 16x

População R: 0; 1/2x; 1x; 2x; 4x; 16x; 32x; 64x

- **Dose (1x):** A dose recomendada de bula conforme momento de aplicação (80% ? > 99%).

- Intervalo utilizar a dose para atingir 99% de controle da população susceptível.

- **Repetibilidade:** repetir o ensaio pelo menos duas vezes;



Controle do capim-amargoso com glyphosate, utilizando como veículo água pura, solução de sulfato de amônio - SA (15 g L<sup>-1</sup>), uréia - U (5 g L<sup>-1</sup>) e solução de U + SA (2,5 + 7,5 g L<sup>-1</sup>). Piracicaba - SP, Carvalho, 2008

- **Outros:**

- Quando necessário adicionar o **adjuvante** (óleo, espalhante) específico para cada herbicida;
- **Volume de aplicação;**
- Observar todos os **fatores de funcionamento** do herbicida de acordo com a textura do solo (herbicidas PRE) e condição de crescimento vigoroso das plantas (herbicidas POS);
- Herbicidas sistêmicos ou contato.

## Momento de aplicação

- Momento de aplicação → Use o momento descrito na bula: altura (cm) ou estágio de crescimento (da folha ou perfilhos) – ALS e ACCase
- *Euphorbia* e *Bidens*: 2 a 4 folhas;
- *Brachiaria* e *Digitaria*: 2 folhas a 2 perfilhos.

### *Euphorbia heterophylla* (ALS – imazethapyr)

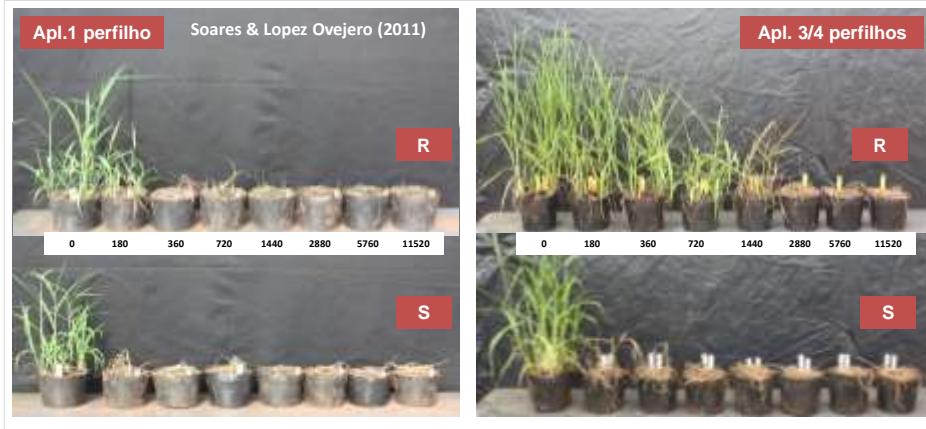
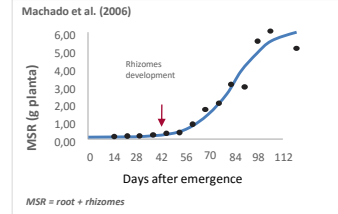
Nome comercial	Formulação	C	Dose
Pivot	Conc. Solúvel	100	1,0 (100)
Imazethapyr Nortox	Conc. Solúvel	100	1,0 (100)
Vezir	Conc. Solúvel	100	1,0 (100)
Dinamaz	WG	700	0,140 (100) + adj. (0,25%)



- **Glifosato (pré ou pós plantio):** Depende do estágio de desenvolvimento da planta infestante – menores doses para a fase inicial de desenvolvimento; maiores doses para a fase adulta ou perenizada. A dose deveria estar correlacionada com o tamanho da planta daninha. As formulações de pós-plantio estão mais organizadas neste sentido.

Nome comercial	Sal	C	Dose rotulo (l/ha; eq. ac.)	
Roundup Original	Isopropilamina	360	1,5 to 4,0	540 a 1440
Roundup WG	Amônio	720	1,5	1080
Roundup Transorb	Isopropilamina	480	2,0 to 4,5	960 a 2160
Roundup Ultra	Amônio	650	0,5 to 2,5	325 a 1625
Roundup Transorb R	Potássio	480	1,0 to 3,0	480 a 1440
Roundup Ready	Isopropilamina	480	-	-
Roundup Ready Milho	Isopropilamina	480	-	-

### *Digitaria insularis* (Glifosato)



## Avaliações e estatística

- Controle visual (%): escala de 0 (sem sintomas) a 100% (planta morta) a 2, 3, 4 e 5 semanas após aplicação dos tratamentos (*rebrotas*);
- Peso fresco e seco: cortar as plantas acima do solo para fazer as avaliações;
- Métodos estatísticos apropriados devem ser utilizados para que as conclusões sejam seguras;
- Aplicação do Teste 'F' e Regressões (Log-logística).

Streibig, 1988

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

Versão que intercepta x - Dados de Controle e Massa

Seefeld et al., 1995

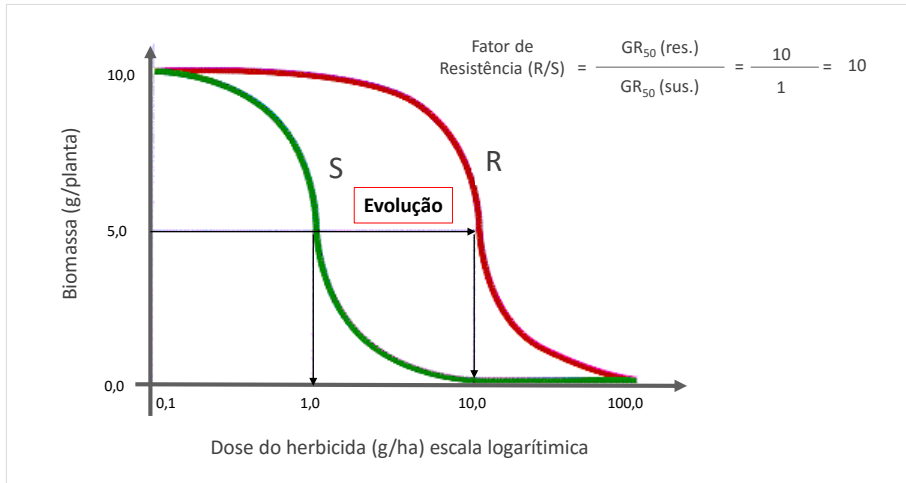
$$y = P_{\min} + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c}$$

Versão que não intercepta x - Dados de Massa (Fresca ou Seca)

y = variável resposta;  
x = dose do herbicida (g ia. ha<sup>-1</sup>)  
P<sub>min</sub> = ponto mínimo da curva

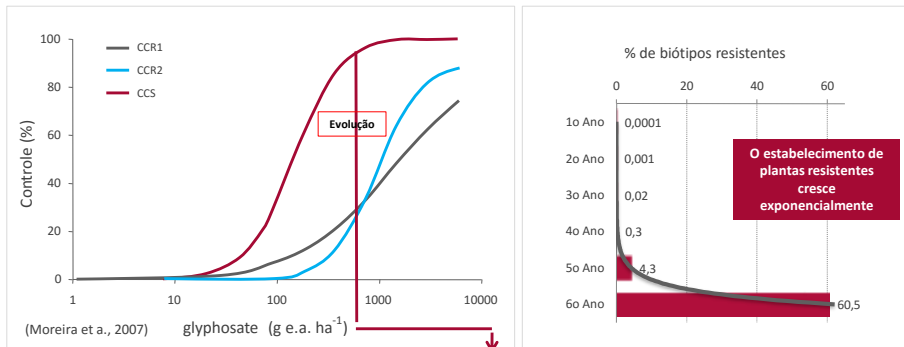
a = P<sub>max</sub> - P<sub>min</sub> (amplitude)  
b = dose p/ 50% de resposta  
c = declividade da curva

### CURVA DE DOSE-RESPOSTA PARA POPULAÇÃO SUSCEPTÍVEL (S) E RESISTENTE (R) – PESO FRESCO OU SECO



Discriminação entre populações R e S utilizando o GR50's (Curvas de dose-resposta)

### CURVA DE DOSE-RESPOSTA PARA POPULAÇÃO SUSCEPTÍVEL (S) E RESISTENTE (R) – CONTROLE VISUAL (%)



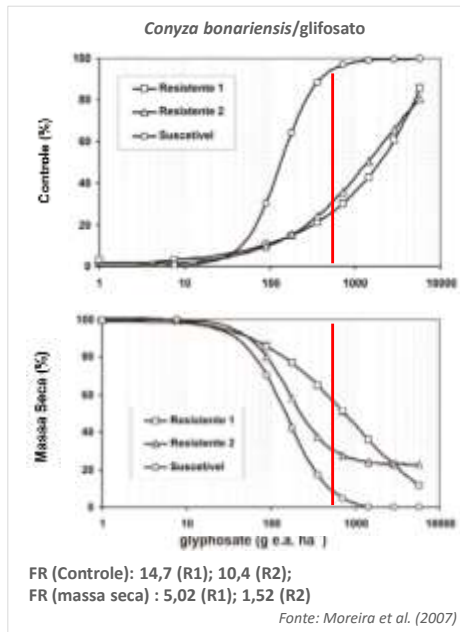
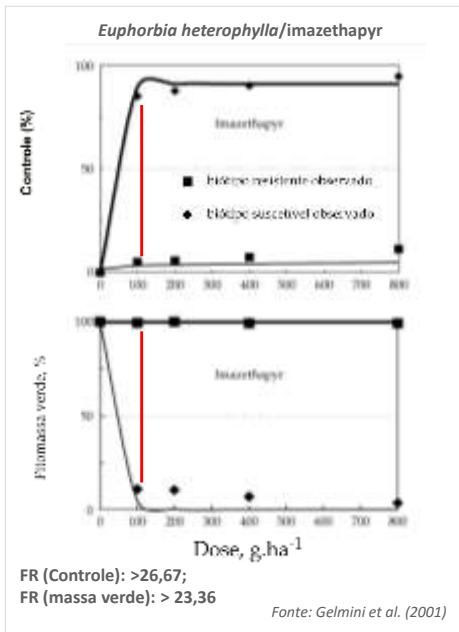
720 g eq ac. (dose com 99% de controle da população S)



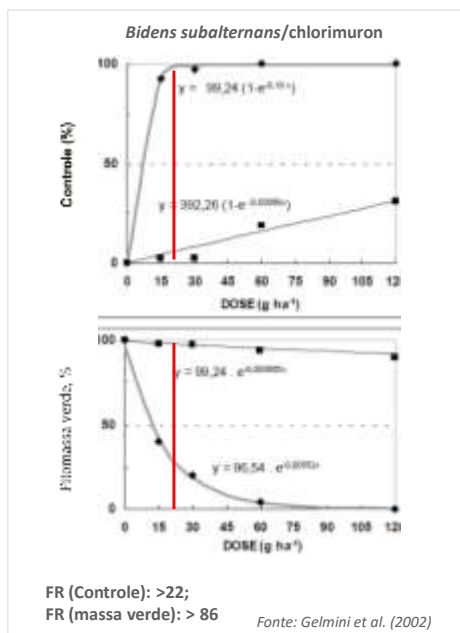
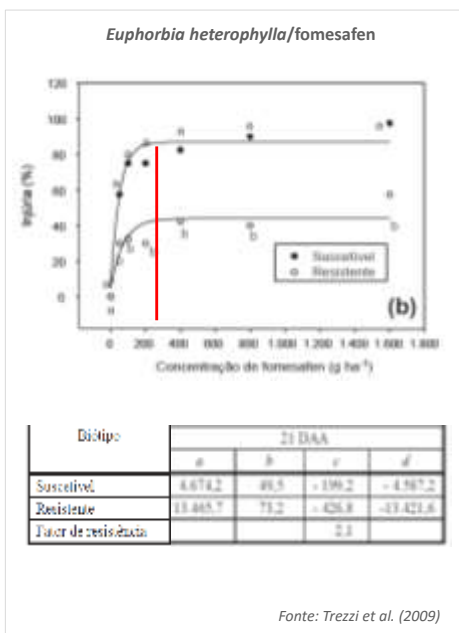
Discriminação entre populações R e S utilizando o C50's (Curvas de dose-resposta)



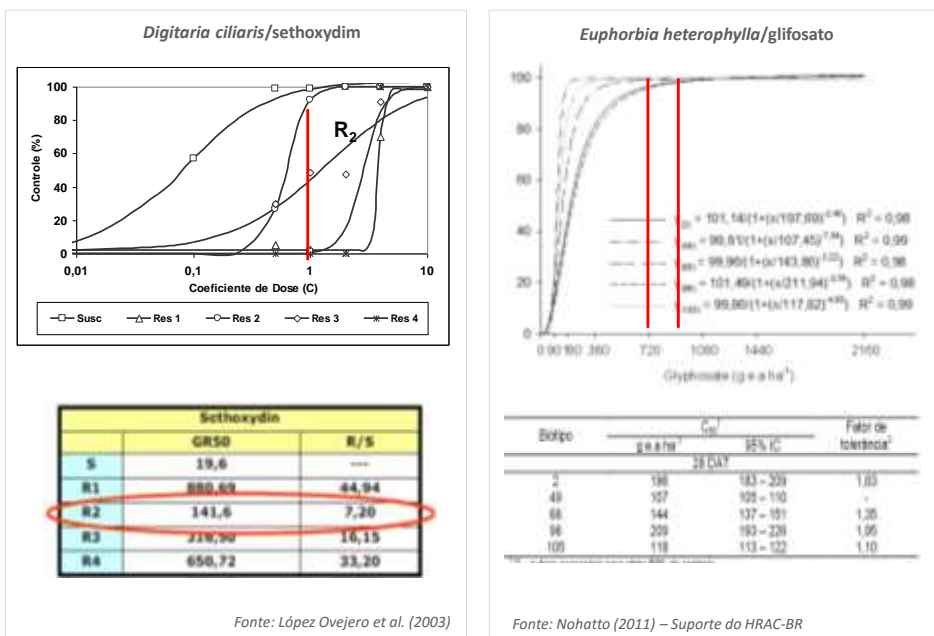
### Curvas de dose-resposta dos herbicidas



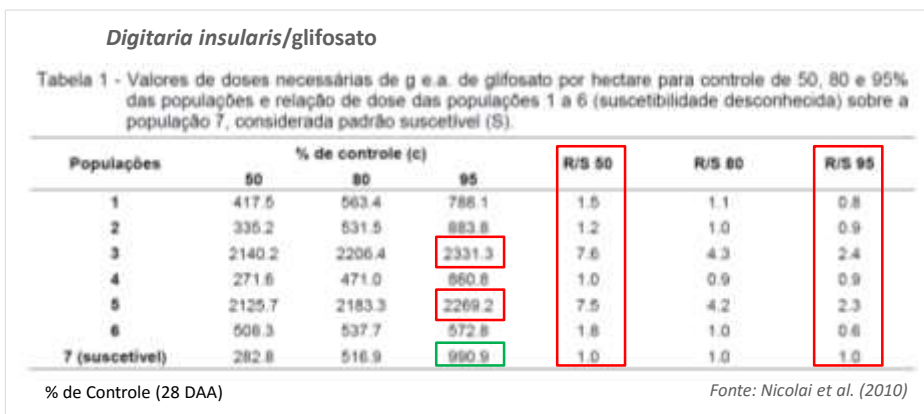
### Curvas de dose-resposta dos herbicidas



## Curvas de dose-resposta dos herbicidas



## Curvas de dose-resposta dos herbicidas - Resultados



Sempre devemos ter estudos de laboratório e campo para definir os resultados e impacto da resistência de plantas daninhas

## Principais métodos de caracterização da resistência de plantas daninhas a herbicidas (Modificado de Carvalho; Christoffoleti; Lopez Ovejero; 2009)

Finalidade	Descrição	Observações/limitações
<b>Sementes coletadas no final da safra – Planejar a próxima safra com o conhecimento da real situação de resistência</b>		
Curvas de dose-resposta	Casa-de-vegetação ou câmara de crescimento	-Utilizado para todos os grupos de herbicidas e plantas daninhas; -Fácil de adotar (não precisa de equipamentos); -Permite conhecer os diferentes graus de resistência; -Para todos os mecanismos de resistência; -Limitada a condições controladas; -Tempo necessário para obter os resultados (meses).

## Seedlings/Placas de Petri

- Sementes são germinadas na presença de uma solução diluída do herbicida e o desenvolvimento subsequente é avaliado.

*Lolium multiflorum*

Fonte: Ribeiro (2008)

Tabela 2.1 - Parâmetros do modelo de regressão não-linear log-logístico<sup>2</sup> com seus respectivos desvios padrões, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), redução de 50% de desenvolvimento ( $GR_{50}$ ) e fator de resistência ( $FR$ ) obtidos no teste de dose-resposta em placa de Petri

Biótipos	Parâmetros					
	a	b	c	$R^2$	$GR_{50}$ (mg e.a. L <sup>-1</sup> )	FR
VA	0,00 (48,48)	89,23 <sup>*</sup> (3,17)	1,69 (0,87)	0,71	183,41 (133,00)	27,46
SM	4,83 <sup>*</sup> (1,22)	90,46 <sup>*</sup> (1,41)	1,12 <sup>*</sup> (0,09)	0,98	6,68 <sup>*</sup> (0,37)	
BR	13,19 (12,94)	98,36 <sup>*</sup> (5,12)	1,31 <sup>*</sup> (0,45)	0,94	55,12 <sup>*</sup> (17,77)	6,09
SBR	0,17 (2,90)	100,06 <sup>*</sup> (3,93)	1,37 <sup>*</sup> (0,21)	0,98	9,05 <sup>*</sup> (0,99)	
C	42,77 <sup>*</sup> (2,78)	93,22 <sup>*</sup> (1,21)	9,59 (20,51)	0,89	115,90 <sup>*</sup> (37,65)	31,41
SR	0,00 (3,97)	99,90 <sup>*</sup> (2,14)	0,67 <sup>*</sup> (0,13)	0,96	3,69 <sup>*</sup> (0,51)	



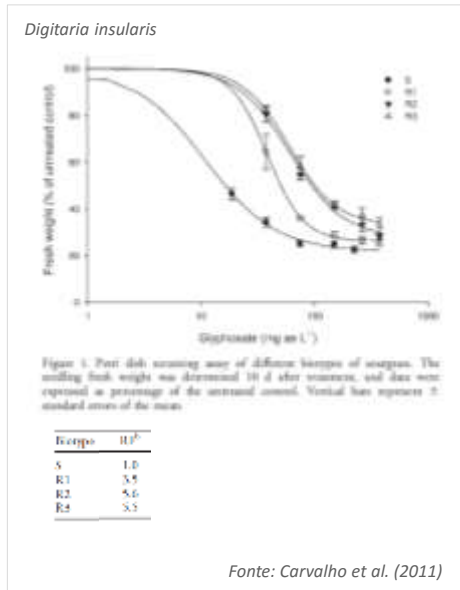
*Bidens spp.*

Fonte: Carvalho et al. (2004)

Tabela 2. Comprimento médio radicular (cm) de quatro biótipos de picão-preto, um suscetível e três resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, após germinação em água, solução de imazaquin e solução de metribuzin.

Biótipos	Soluções		
	água	imazaquin	metribuzin
Suscetível	2,355 A a	0,820 B b	1,370 B a
Resistente 1	1,960 A a	1,923 A a	1,097 B a
Resistente 2	2,700 A a	1,835 B a	1,575 B a
Resistente 3	2,450 A a	1,750 AB a	1,730 B a

## Seedlings/Placas de Petri



### Principais métodos de caracterização da resistência de plantas daninhas a herbicidas (Modificado de Carvalho; Christoffoleti; Lopez Ovejero; 2009)

Finalidade	Descrição	Observações/limitações
<b>Sementes coletadas no final da safra – Planejar a próxima safra com o conhecimento da real situação de resistência</b>		
Curvas de dose-resposta	Casa-de-vegetação ou câmara de crescimento	-Utilizado para todos os grupos de herbicidas e plantas daninhas; -Fácil de adotar (não precisa de equipamentos); -Permite conhecer os diferentes graus de resistência; -Para todos os mecanismos de resistência; -Limitada a condições controladas; -Tempo necessário para obter os resultados (meses).
Seedling/Placas de petri	Câmara de germinação	- Herbicidas que tem potencial de inibir a germinação; - Baratos e resultados mais rápidos que testes em potes (10 a 14 dias); - Não são adequados para todas as espécies de plantas daninhas e herbicidas.

## SYNGENTA QUICK-TEST (QT)



Coleta das plantas (50 plantas)



Cortes (2 cm de parte aérea e 0,5 cm de raiz)



Aplicação (5 a 7 cm)

Fonte: Boutsalis (2001)

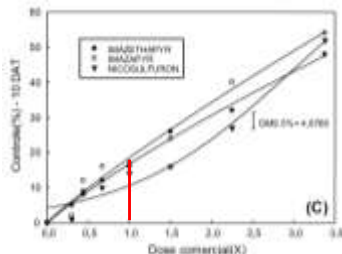
- Plantas daninhas:
  - Gramíneas (2 ou 3 perfilhos);
  - Flexível quanto ao estágio da planta daninha (perfilhada a florescimento);
  - Dicotiledôneas: capacidade de recuperação varia de espécie para espécie e o tamanho das raízes e caule (*Bidens*, *Amaranthus*, *Raphanus*, *Polygonum*)
  - 25 a 40 dias para obter os resultados;
  - Não apresenta biótipos suscetíveis.

## TESTE RÁPIDO DE IMERSÃO FOLIAR (UFRGS Super-Quick Test)

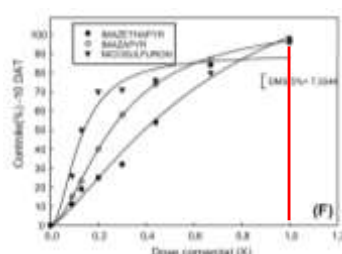
- Coleta cuidadosa de plântulas de EPHHL no campo e a aplicação do método em laboratório, com a utilização de concentrações discriminatórias de biótipos R e S.

*Euphorbia heterophylla*

Fonte: Trezzi et al (2011)



Controle dos biótipo resistente aos 10 dias após imersão



Controle dos biótipo suscetível aos 10 dias após imersão

- Plântulas retiradas do substrato (raízes lavadas e armazenadas em frasco com água destilada por no máximo duas horas);
- Imersão por 2 segundos da parte aérea de plântulas no estágio de duas folhas verdadeiras na solução herbicida; transferidas para frascos e mantidos em câmara de crescimento (Laboratório);
- Dose comercial altamente discriminadora (ALS: imazapyr, imazethapyr, nicosulfuron; PROTOX: fomesafen, lactofen e carfentrazone);
- Sintomas: 4 a 10 dias para ALS e 1 dia para PROTOX em plantas suscetíveis (até 10 dias).
- Portes (2005)/Vidal et al. (2005): ALS e ACCase.

## Coletas de plântulas no campo (F abc/Esalq)

- Coleta de plântulas (picão preto) no campo e fazer o transplante em vasos, após recuperação aplicar as doses dos herbicidas suspeitos (1x e 2x).

Picão Preto – Pirai do Sul (02/03)

Fonte: Penckowski; Podolan; Ovejero (2003)



Chlorimuron (100 g/ha)

Testemunha



Fomesafen/Bentazon (0,6/0,8 l/ha)

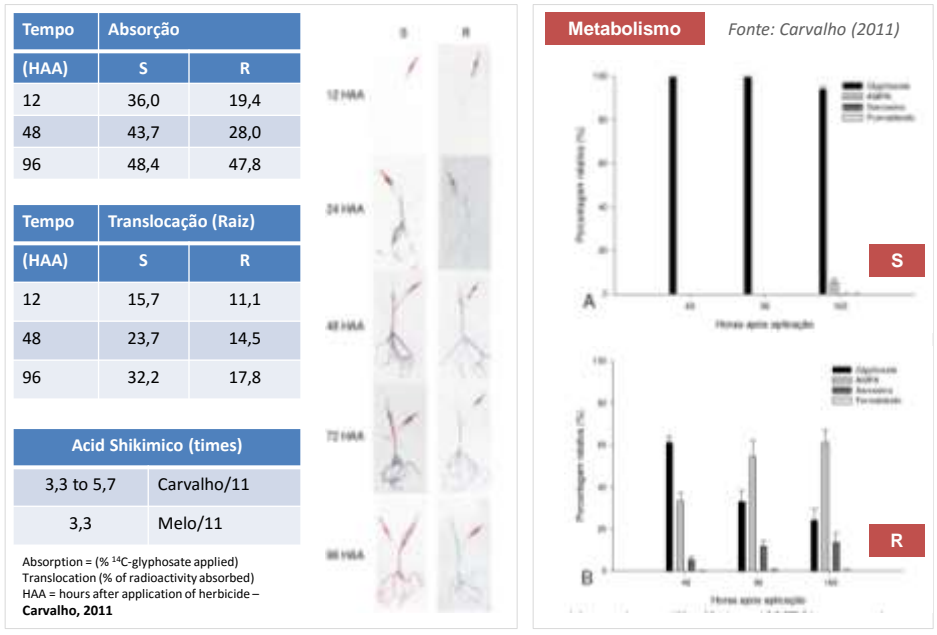
Testemunha

- Após coleta realizar o manejo alternativo conforme histórico da área e da região;
- Teste para confirmação da resistência;
- Sintomas: 25 a 30 dias.

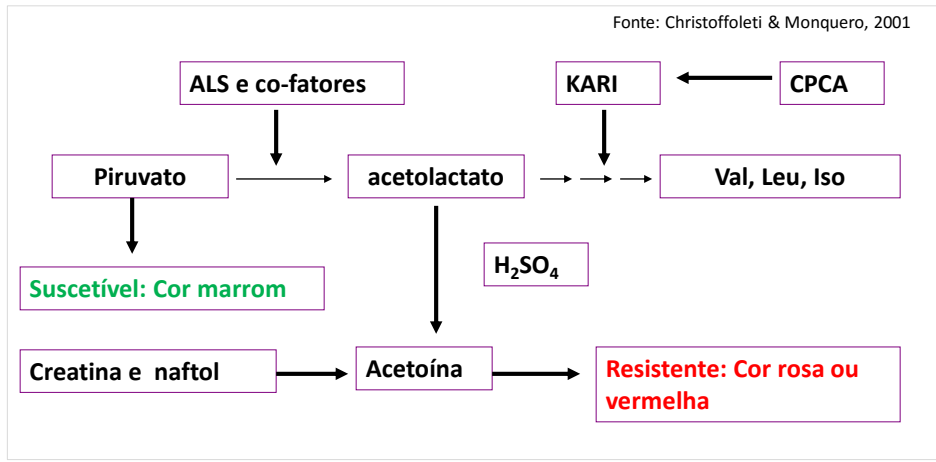
## Principais métodos de caracterização da resistência de plantas daninhas a herbicidas (Modificado de Carvalho; Christoffoleti; Lopez Ovejero, 2009)

Finalidade	Descrição	Observações/limitações
<b>Sementes coletadas no final da safra – Planejar a próxima safra com o conhecimento da real situação de resistência</b>		
Curvas de dose-resposta	Casa-de-vegetação ou câmara de crescimento	-Utilizado para todos os grupos de herbicidas e plantas daninhas; -Fácil de adotar (não precisa de equipamentos); -Permite conhecer os diferentes graus de resistência; -Para todos os mecanismos de resistência; -Limitada a condições controladas; -Tempo necessário para obter os resultados (meses).
Seedling/Placas de petri	Câmara de germinação	- Herbicidas que tem potencial de inibir a germinação; - Baratos e resultados mais rápidos que testes em potes (10 a 14 dias); - Não são adequados para todas as espécies de plantas daninhas e herbicidas.
<b>Plântulas – Evitar que as infestantes formem sementes e a mato-competição com a cultura</b>		
Parte aérea das plantas	Transplante em condições controladas	- Testes rápidos - “quick test” – 10 dias a 4 semanas - Custo baixo; - Podem ser realizados durante a safra; - Para herbicidas pós-emergentes; - Fácil de adotar (não precisa de equipamentos); - Para todos os mecanismos de resistência.
<b>Populações no campo – Confirmação, impacto e sugestão de manejo alternativo</b>		
Testes de eficácia de herbicidas	Campo	- Comparação de tratamentos do herbicida com suspeita de resistência em diferentes doses e herbicidas alternativos; - População suscetível; - Testes necessários para confirmar a importância agrônômica da resistência.

## Absorção, translocação, shikimato e metabolismo (DIGIN)



## Bioensaio de determinação da sensibilidade da ALS a herbicidas inibidores desta enzima



O ácido ciclopropanodicarboxílico (CPCA) é usado para inibir a cetoácido reductoisomerase (KARI).

# Atividade da ALS

Fonte: Oliveira et al, 2002

- **Objetivo:**

- Avaliar o efeito do herbicida imazaquin na atividade da ALS extraída das plantas de *Euphorbia heterophylla* resistentes e suscetíveis ao produto;
- Atividade da ALS extraída das folhas das plantas (21 dias) foi determinada na presença de doses de imazaquin (Protocolo Wright & Penner, 1998).
- $I_{50}$  = Concentração de imazaquin necessária para inibir 50% da atividade da ALS (uM)

- **Resultados:**

- Biótipos (RS):  $I_{50}$  = 1961,3 (R); e  $I_{50}$  = 13, 8 (S);
- Biótipos (PR e MG-Viçosa):  $I_{50}$  = >5000 (R);  $I_{50}$  = > 1000 (S);
- Biótipos (MG-Sete Lagoas):  $I_{50}$  = 12,2
- A medida in vitro da atividade da ALS é um método sensível para determinação da presença de biótipos resistentes à ação do herbicida imazaquin

## Principais métodos de caracterização da resistência de plantas daninhas a herbicidas (Modificado de Carvalho; Christoffoleti; Lopez Ovejero; 2009)

Finalidade	Descrição	Observações/limitações
<b>Absorção e translocação (sementes ou plântulas)</b>		
Absorção diferencial	Lavagem das folhas após aplicação e medida da quantidade de herbicida retido pela planta x quantidade lavada.	- Utilização de produtos radiativos, avaliado através da lavagem do produto da superfície foliar após aplicação.
Translocação diferencial	Segmentação das principais partes da planta e medida da concentração do herbicida na parte aplicada da planta x demais partes	- Análise da radioatividade do herbicida translocado nos diferentes segmentos da planta.
<b>Metabolismo e Metodos através da extração de DNA (sementes ou plântulas)</b>		
Metabolismo diferencial	Análise dos metabólitos e produto original, normalmente analisado por HPLC (estudos radioativos ou outros)	- O método deve estar baseado em conhecimentos dos processos metabólicos envolvidos na degradação do herbicida.
Atividade enzimática	Teste 'in vitro' envolvendo a enzima das plantas resistentes e suscetíveis. Afinidade do herbicida ao sítio de ação/eficiência na inibição do sítio de ação.	- Acúmulo de substratos que antecede a reação enzimática inibida, exigindo protocolos bioquímicos.
Outros	Transpiração e fotossíntese; Acumulação de Shikimato; Metodos para medir o shikimato; Extração de anaize de o DNA	
<b>Vantagens e desvantagens</b>		
Tempo necessário: alguns horas, dias a várias semanas; Podem ser realizados durante a safra; Difícil de adotar: Metodologias laboratoriais sofisticadas e equipamentos de leitura espectométrica e pessoas especializadas; Reagentes caros; Conforme plantas daninha e mecanismos de resistência; Resultados simples (afirmativo ou negativo).		



## Metodologias científicas para detecção da resistência de plantas daninhas

- Testes confiáveis para confirmar a resistência de plantas daninhas são um pré-requisito essencial para a implementação de estratégias efetivas de manejo integrado;
  - Teste ideal: rápido, acurado, barato e prontamente disponível;
  - Locais dos testes:
    - Campo
    - Casa-de-vegetação
    - Laboratório
- 
- Medidas na área com falhas
    - Coleta de sementes e plantas para confirmar a resistência;
    - Parcela com a finalidade de coleta de sementes;
    - Posteriormente controlar o restante da população de plantas daninhas (Catação).