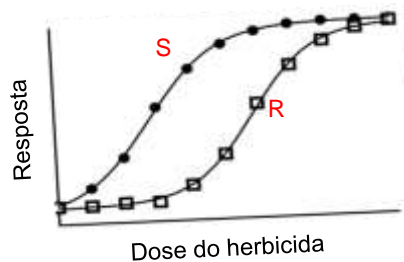




Objetivos da palestra

1. Conhecer os principais métodos de detecção
2. Avaliar as vantagens e desvantagens de cada um
3. Verificar a praticabilidade de uso
4. Analisar como podem auxiliar no manejo da resistência e nas pesquisas com resistência



14/01/2016

pjchrist@usp.br

2

Critérios para confirmação de plantas daninhas resistentes a herbicidas

“International Survey of Herbicide-Resistant Weeds”

<http://www.weedscience.org/summary/home.aspx>

Para um biótipo ser listado é necessário:

1. Obedecer a definição de resistência da WSSA
2. Dados de confirmação seguindo protocolos científicos
3. A resistência deve ser herdável
4. Demonstração de efeitos práticos no campo

Falha na conformidade com qualquer um destes critérios impede o registro do caso.

INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTANT WEEDS
Thursday, October 31, 2013

Home | Summaries | Resistant Weeds | Add New Case | Herbicides | Researchers | Literature | Help

There are currently **404 unique cases** (species x site of action) of herbicide resistant weeds globally, with **226 species** (130 dicots and 90 monocots). Weeds have evolved resistance to **21 of the 25 known herbicide sites of action** and to **148 different herbicides**. Herbicide resistant weeds have been reported in **66 crops in 81 countries**. There are 1733 registered users of this website and 412 weed scientists have contributed new cases of herbicide resistant weeds. To see a list of the most recent additions to the site [Click Here](#).

SELECT LISTS OF HERBICIDE-RESISTANT WEEDS BY ONE OF THE BELOW

| | | | |
|--------------------------|----|------------------|----|
| Weed Species | Go | Weed Common Name | Go |
| Herbicide Site of Action | Go | Crop | Go |
| US State | Go | Country | Go |

[For 1 type of herbicide \(subscribes the group\)](#)

About the Survey

The purpose of this survey is to monitor the evolution of herbicide-resistant weeds and assess their impact throughout the world. The site is a global collaboration between weed scientists with a common goal of understanding, preventing and managing the occurrence of herbicide-resistant weeds.

Detectar a resistência o mais rápido possível



Critério 1. Obedecer a definição de resistência

Heap and Lebaron, 2001; in *Herbicide Resistance and World Grains*

"A capacidade evolutiva de uma população de plantas daninhas, anteriormente suscetível ao herbicida, em resistir a um herbicida, e completar o seu ciclo de vida, quando o herbicida é usado no seu ritmo normal numa situação agrícola"

"The evolved capacity of a previously herbicide-susceptible weed population to withstand a herbicide and complete its life cycle when the herbicide is used at its normal rate in an agricultural situation"

Critério 2. Ter dados de confirmação seguindo protocolos científicos aceitáveis

Um método de detecção deve ser:

- ✓ Rápido
- ✓ Preciso
- ✓ Baixo custo
- ✓ De fácil execução
- ✓ Fornecer resultados precisos dos impactos da resistência nas atividades no campo

O mais importante fator de determinação da resistência é a quantificação do grau de sensibilidade da planta ao herbicida

1 – Observação no campo

Alguns aspectos que podem ser observados no campo que indicam a causa como sendo resistência:

A – Presença de plantas mortas ao lado de plantas vivas





1 – Observação no campo

B – Histórico de controle da planta daninha na área

C – Histórico do uso do herbicida na área

D – Ocorrência da resistência nesta planta Daninha na região



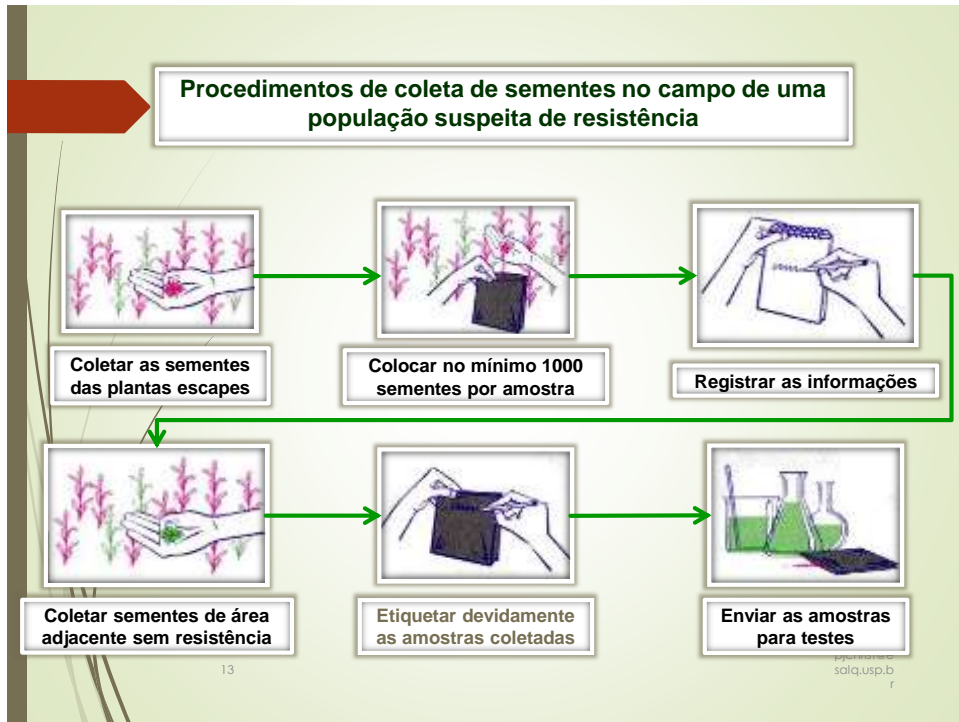
2 – Coleta das sementes no campo

Bons resultados somente são obtidos dependendo da qualidade de coleta das sementes no campo:

A – Coletar sementes na maturidade

B – Coletar de forma cuidadosa colocando em sacos





2 – Coleta das sementes no campo

- C – Coletar no centro da reboleira em área de 100 x 50 m**
- D – Qualidade da semente é mais importante que quantidade**
- E – Não colete em condições de alta umidade**
- F – Nunca armazene em sacos plásticos**
- G – Secar imediatamente após coleta**
- H – Beneficiar as sementes**



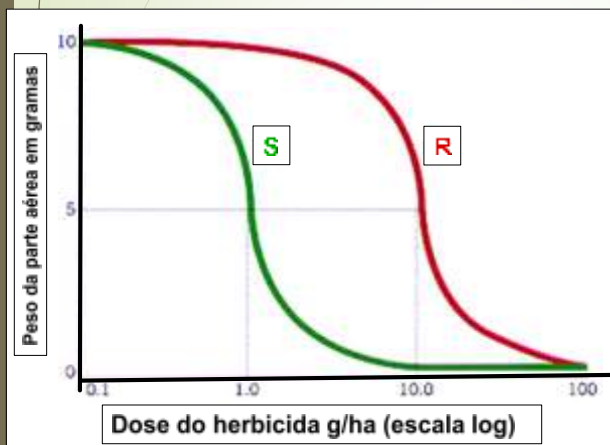
3 – Bioensaio com plantas inteiras

- ✓ Avaliação visual da mortalidade e peso verde ou seco da fitomassa
- ✓ Sempre é necessário uma população suscetível para comparação
- ✓ No delineamento do experimento é importante ter assessoria estatística



Curva de dose-resposta

- ✓ Permite quantificar o grau de resistência em relação a população padrão suscetível, normalmente a 50% de controle



GR_{50} suscetível = 1,0
 GR_{50} resistente = 10,0

$$IR = \frac{GR_{50} R}{GR_{50} S} = \frac{10,0}{1,0} = 10,0$$

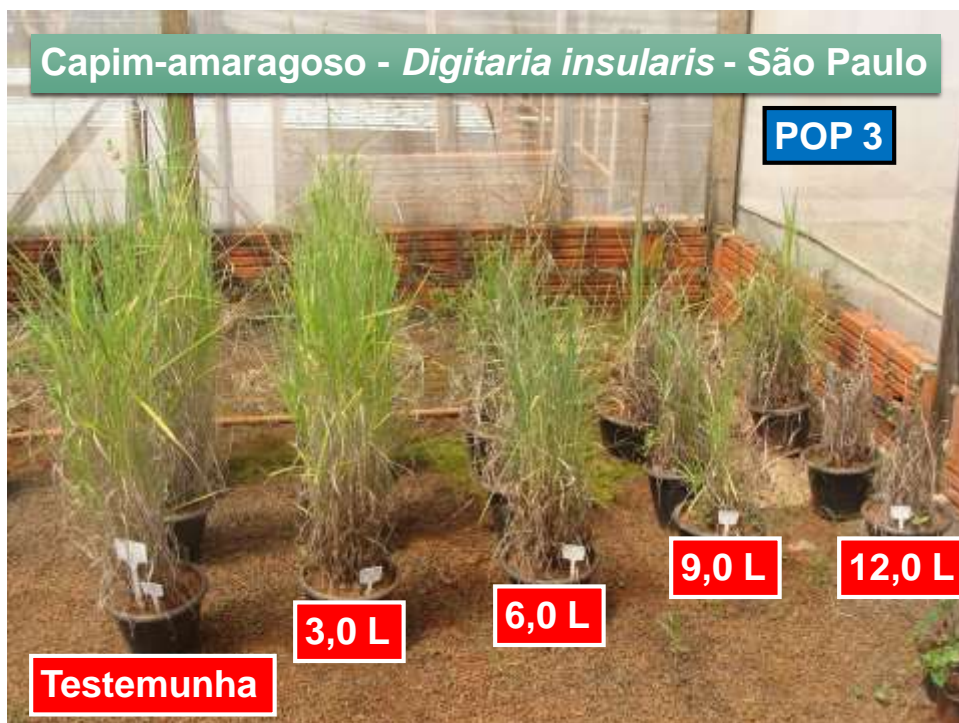
IR = índice de resistência

Quantas doses?

- 6 – Mínimo
- 8 – Bom
- 10 – Excelente

Amplitude das doses

- ✓ Equidistância no eixo X
- ✓ Múltiplas de 2, 4 ou 10
- ✓ Depende da eficácia do herbicida (Controles extremos superiores e inferiores)





Análise dos Dados

1. Análise da Variância

1.1. Aplicação do Teste 'F'

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|---------------|---------|--------|
| Espécie | 1 | 17.257813 | 17.257813 | 0.243 | 0.6233 |
| Dose | 7 | 155074.742188 | 22153.534598 | 311.489 | 0.0000 |
| Espécie*Dose | 7 | 194.929688 | 27.847098 | 0.392 | 0.9055 |
| Bloco | 7 | 8080.367188 | 1154.338170 | 16.231 | 0.0000 |
| erro | 105 | 7467.757813 | 71.121503 | | |
| Total corrigido | | 127 | 170835.054688 | | |
| CV (%) = | 13.92 | | | | |
| Média geral: | 60.5859375 | Número de observações: | | 128 | |

Dose-resposta



Análise dos Dados

1. Análise da Variância

1.1. Aplicação do Teste 'F'

Efeito Significativo?

Não – Fim da Análise!

Sim...

2. Qual a natureza dos dados?

2.1. Qualitativos

Comparações: Contrastes, Tukey, Duncan, etc.

2.2. Quantitativos

Regressões (Log-logística)

Dose-resposta



Regressões

1. Mais utilizadas:

1.1. Log-Logística

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

Streibig, 1988

y = variável resposta;

x = dose do herbicida (g i.a. ha⁻¹)

$Pmín$ = ponto mínimo da curva

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

Seefeld et al., 1995

a = $Pmax - Pmin$ (amplitude)

b = dose p/ 50% de resposta

c = declividade da curva

Dose-resposta



Regressões

1. Mais utilizadas:

1.1. Log-Logística

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

Streibig, 1988

Versão que intercepta x
Dados de Controle e Massa

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

Seefeldt et al., 1995

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

Dose-resposta



Regressões

1. Mais utilizadas:

1.1. Log-Logística

Vantagens:

- Parâmetros com boa interpretação biológica
- Estimativa de C_{50} ou GR_{50}

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

Equações Inversas para cálculo matemático:

$$x = b * \sqrt[c]{\frac{a}{y} - 1}$$

$$x = b * \sqrt[c]{\frac{a}{(y - P_{\text{mín}})} - 1}$$

Dose-resposta

Programas Estatísticos

R
SAS
Sigmaplot
Tablecurve 2D
Labfit
Curve expert
Excel

Apresentação dos dados

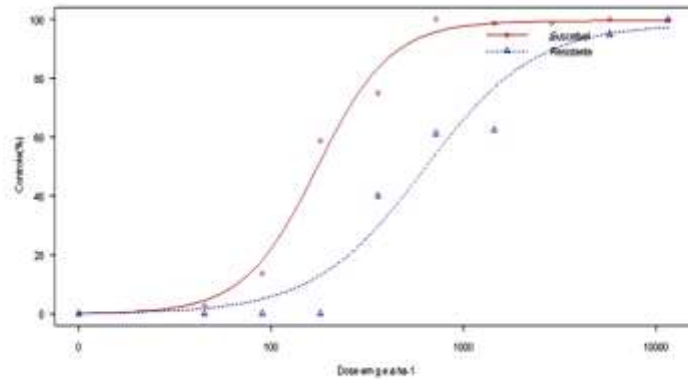
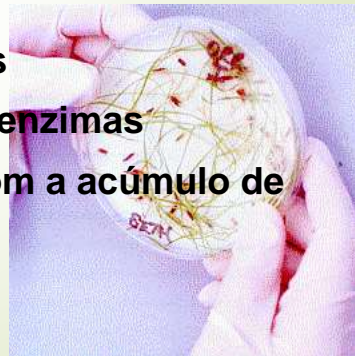


Figura 1.1 – Curva de dose-resposta para a avaliação visual da porcentagem de controle (C) dos biótipos suscetível e resistente, 28 dias após a aplicação (DAA) de glyphosate no estágio de seedling

Outras técnicas de diagnose

- ✓ Testes em vasos, porém com plantas coletadas no campo.
- ✓ Bioensaio de germinação em Placas de petri
- ✓ Fluorescência da clorofila
- ✓ Flotação de discos foliares
- ✓ Bioensaio de atividade de enzimas
- ✓ Teste de discos foliares com a acúmulo de ácido shiquímico



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) |
| | | <i>Fonte: Boutsalis (2001)</i> |



Bioensaio com Shikimato

Shaner et al. 2005

- ✓ Quando discos de folhas suscetíveis são tratados com glifosate há acúmulo de shikimato



Figure 1: Aromatic amino acid pathway and site of glyphosate inhibition

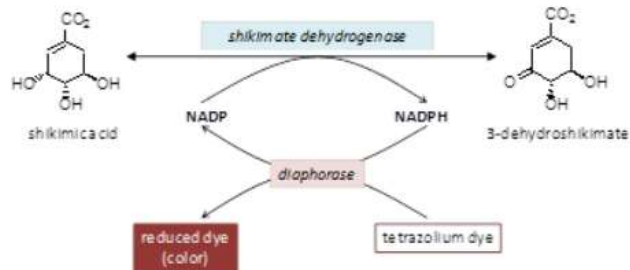
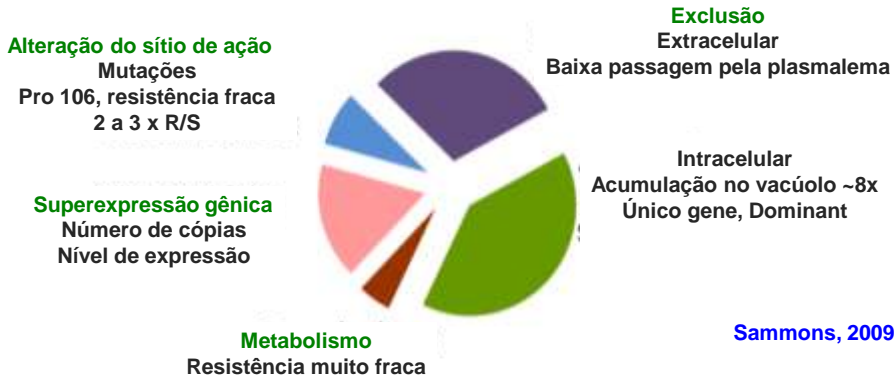


Figure 2: Couple reaction between shikimate dehydrogenase and diaphorase

Prós e contras do bioensaio

| | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Não destrutivo ✓ Tem utilidade para o “screening” de plantas no campo ✓ Pode ser usado sacarose e evitar a necessidade de luz ✓ Resposta dependente da dose ✓ Diversos usos na pesquisa | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Teoricamente deve funcionar para diferentes espécies ✓ Difícil extrapolar resultados para o campo |
|---|--|

Os mecanismos de resistência ao glyphosate são iguais em magnitude ou probabilidade



Possivelmente Combinação de Mecanismos



Descobertas recentes sobre os mecanismos de resistência de plantas daninhas ao glifosato

**Alteração no
sítio de ação
(Proline 106)**

Translocação

Sequestração

**Amplificação
gênica**

Resistência da *Ambrosia trifida* nos Estados Unidos



Resistência da *Ambrosia trifida* nos Estados Unidos



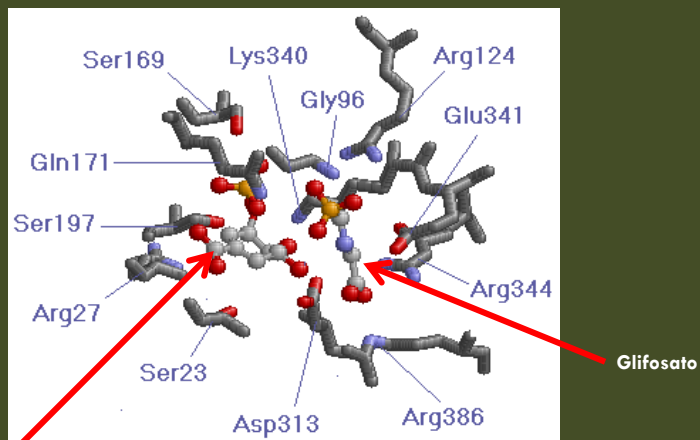
Resistência da *Ambrosia trifida* nos Estados Unidos



Resistência da *Ambrosia trifida* nos Estados Unidos



Alteração no sítio de ação (Ng, 2002)

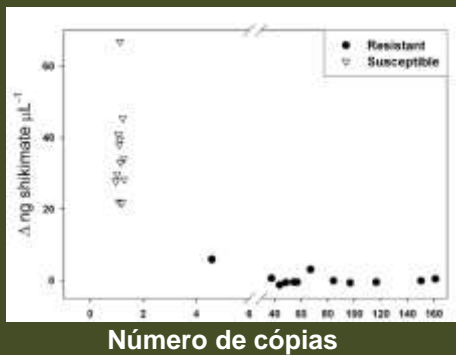


Aminoácidos residuais conservados no sítio ativo do glyphosate e do shiquimato



Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*

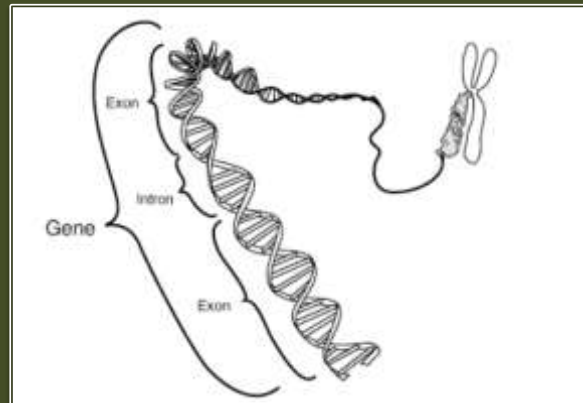
Todd A. Gaines^{a,1}, Wenli Zhang^b, Dafu Wang^c, Bekir Bukun^a, Stephen T. Chisholm^a, Dale L. Shaner^d, Scott J. Nissen^a, William L. Patzoldt^a, Patrick J. Tranel^e, A. Stanley Culpepper^f, Timothy L. Grey^g, Theodore M. Webster^h, William K. Vencill^h, R. Douglas Sammons^c, Jiming Jiang^b, Christopher Prestonⁱ, Jan E. Leach^a, and Philip Westra^{a,2}



Um incremento no número de cópias genômicas da EPSPS correlaciona-se com acúmulo reduzido de shikimate em 12 indivíduos (círculos cheios) e suscetíveis círculos vazios em *Amaranthus palmeri*.

Definição de Introns e exons

Ítrons são regiões não-codificantes do RNA mensageiro, enquanto os éxons são regiões codificantes do RNA m. Eles estão relacionados a uma etapa muito importante do processo de síntese proteica dos eucariontes, denominada “splicing”. Neste processo (cujo nome significa “ato de cortar” em português), regiões específicas do RNA mensageiro (os ítrons) são recortadas e eliminadas.



Número de cópias genômicas medidas usando primers qPCR dentro de um intron é semelhante ao número de cópias medida usando o prime qPCR dentro de um exon de indivíduos R e S

-EPSPS:ALS Relative Genomic Copy Number-

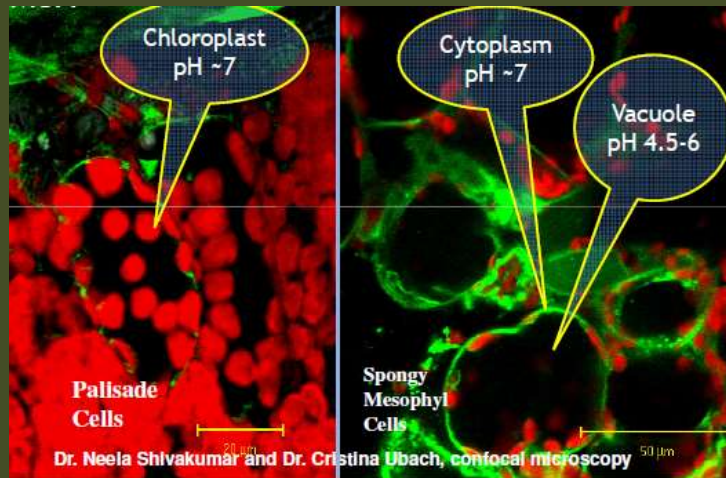
| | R1 | R2 | R3 | S1 | S2 | S3 |
|--------|-----------|----------|----------|------------|------------|------------|
| Exon | 108 (4.4) | 84 (8.6) | 60 (0.5) | 1.0 (0.06) | 0.9 (0.02) | 0.9 (0.01) |
| Intron | 106 (1.2) | 73 (3.0) | 57 (5.1) | 0.8 (0.04) | 0.9 (0.07) | 1.0 (0.07) |

Data are means with standard errors in parentheses.

doi:10.1371/journal.pone.0065819.t001

Gaines TA, Wright AA, Molin WT, Lorentz L, et al. (2013) Identification of Genetic Elements Associated with EPSPS Gene Amplification. PLoS ONE 8(6): e65819. doi:10.1371/journal.pone.0065819
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0065819>

Sequestração através do vacúolo



Sammons 2010

O mecanismo de resistência não ocorre no frio

Buva resistente é suscetível quando em condições de frio



Sequencia geral para testar se um população é resistente

1. Analisar todas as possíveis causas das falhas
2. Fazer um levantamento da distribuição no campo
3. Coleta de plantas ou sementes da área com problema
4. Armazenar as sementes adequadamente
5. Fazer um teste de pré-germinação
6. Escolher o tipo de ensaio e fazer o delineamento
7. Selecionar uma população padrão de suscetibilidade da mesma região
8. Análise dos dados e interpretação dos resultados

Obrigado

Pedro Jacob Christoffoleti - ESALQ/USP
Dep. Produção Vegetal
Fone ESALQ - 19 - 3429 4190 – Ramal 213
Celular – 19 - 99727 8314
E-mail - pjchrist@usp.br