

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

USO RECORRENTE DE PROTETOR E MISTURAS DE HERBICIDAS EM
SUBDOSES AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DE *Echinochloa crus-galli*

Carlos Alberto Gonsiorkiewicz Rigon
Engenheiro Agrônomo/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração: Sistemas de produção vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Rigon, Carlos Alberto Gonsiorkiewicz
USO RECORRENTE DE PROTETOR E MISTURAS DE HERBICIDAS
EM SUBDOSES AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DE Echinochloa
crus-galli / Carlos Alberto Gonsiorkiewicz Rigon. --
2019.
182 f.
Orientador: Aldo Merotto Junior.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2019.

1. resistência. 2. evolução. 3. metabolização. 4.
isoxadifen-p-etílico. 5. subdose. I. Merotto Junior,
Aldo, orient. II. Título.

CARLOS ALBERTO GONSIORKIEWICZ RIGON
Engenheiro Agrônomo - UFSM

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 13.05.2019
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 20.08.2019
Por

ALDO MEROTTO JUNIOR
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

CARLA ANDRÉA DELATORRE
PPG Fitotecnia/UFRGS

CATARINE MARKUS
Faculdade de Agronomia/UFRGS

ANDRÉ DA ROSA ULGUIM
UFSM

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Dedico

aos meus pais João Feliciano Soares Rigon e Rosane Maria Gonsiorkiewicz,
ao meu irmão João Paulo Gonsiorkiewicz Rigon e
ao meu amor Joice Abramowicz.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir concluir esta etapa e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Ao Professor Aldo Merotto Júnior, pela orientação acadêmica, conselhos, amizade, pleno entendimento e apoio nos momentos mais difíceis do curso. Levarei o Sr. no coração para o resto da minha vida, como exemplo pessoal e profissional.

À minha família, meus pais João Feliciano Soares Rigon e Rosane Maria Gonsiorkiewicz, meu irmão João Paulo Gonsiorkiewicz Rigon e sua esposa Sílvia Capuani, pelo amor incondicional, conselhos, apoio em toda esta jornada e por acreditarem em mim. Obrigado por estarem próximos no momento em que mais precisei. Juntos conseguimos vencer a doença e enfrentar todos os obstáculos que surgiram durante esse percurso. Agradeço a compreensão pela minha ausência nos períodos de estudos.

À minha noiva Joice Abramowicz, pelo seu amor incondicional, carinho e amizade. Obrigado pela sua dedicação diária ao nosso amor. Obrigado pelos conselhos e por acreditar em nós. Agradeço pelos cuidados incondicionais durante minha doença. Juntos conseguimos vencê-la! Você é um exemplo e orgulho para mim.

Ao meu amigo Luan pela grande amizade mantida ao longo dos anos, pelo companheirismo, conselhos, trocas de informações e pelo apoio incondicional no momento de minha doença.

Aos meus amigos e colegas do grupo de herbologia Andrew, Christian, Emerson, Luan, Mateus, Tiago, Rafael e Walker pelo convívio diário, conselhos, descontrações, trocas de informações e amizade. Agradeço muito pelo apoio no momento em que precisei.

Aos meus amigos e amigas de iniciação científica Eduardo, Estéfani, Enrico, Guilherme, Paula, Natane e Joana pelo convívio diário, descontrações e auxílio nas atividades de pesquisa, mesmo no momento em que estive ausente.

Aos amigos Cátia, Cristiano, Eduardo, Emílio, Itacir, Jéssica e Maike pelo convívio diário e amizade.

Aos Professores, servidores e técnicos administrativos do Departamento de Plantas de Lavoura e do PPG Fitotecnia pelo profissionalismo e ajudas nas atividades deste trabalho.

Às professoras Catarine Markus e Carla Andrea Delatorre e ao professor André da Rosa Ulguim, pela solicitude e por aceitarem participar do momento de avaliação da dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que sempre torceram por mim e se fizeram presentes nesta etapa de minha vida!

USO RECORRENTE DE PROTETOR E MISTURAS DE HERBICIDAS EM SUBDOSES AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DE *Echinochloa crus-galli*¹

Autor: Carlos Alberto Gonsioriewicz Rigon
Orientador: Prof. Aldo Merotto Jr.

RESUMO

O capim-arroz é uma das espécies de plantas daninhas com mais casos de resistência aos herbicidas. Os fatores responsáveis pelo aumento da metabolização dos herbicidas na espécie são pouco estudados. O uso de protetores para aumentar a seletividade nas culturas e da mistura de herbicidas para aumentar o espectro de ação podem interferir na dinâmica de metabolização dos herbicidas em plantas daninhas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do protetor isoxadifen e da mistura dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir na evolução da resistência causada por incremento de metabolização em *Echinochloa crus-galli*. Os biótipos utilizados foram MOST (suscetível ao fenoxaprope e imazetapir) e CAMAQ (resistente por metabolização ao imazetapir). Inicialmente foram realizados experimentos para a determinação das maiores doses que resultaram na sobrevivência de plantas em relação aos efeitos do herbicida fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen no trabalho sobre protetor e, fenoxaprope, imazetapir e a mistura destes no trabalho sobre misturas. Posteriormente, foram realizados experimentos de seleção por duas gerações através da aplicação de subdoses destes produtos. Curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada com os herbicidas foram realizadas para avaliar a sobrevivência e crescimento de plantas. O fator de resistência (FR) para a geração G2 selecionada com fenoxaprope em relação à G0 foi de 2,3 e 2,2 para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. O FR da geração G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen em relação à G0 aumentou para 3,3 e 1,8 para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. A seleção com subdoses da mistura de fenoxaprope + imazetapir proporcionou maior tolerância nas plantas da G2 selecionadas, resultando em FR de 1,6 e 3,1 para MOST e CAMAQ, respectivamente, em comparação com a G0. As plantas selecionadas tanto com fenoxaprope associado ao protetor isoxadifen quanto com a mistura de fenoxaprope e imazetapir apresentaram aumento da tolerância a outros herbicidas, principalmente aos herbicidas cialofope, diclofope e quincloraque. O biótipo CAMAQ foi mais propenso para a evolução da resistência aos outros herbicidas. O protetor isoxadifen proporcionou aumento da sobrevivência e diminuição da eficiência de controle em relação às subdoses do herbicida fenoxaprope em plantas da geração G2 selecionadas. O herbicida fenoxaprope em mistura com o herbicida imazetapir em subdoses pode favorecer a evolução da resistência a estes e a outros herbicidas, principalmente em plantas que apresentam resistência associada ao incremento de metabolização.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (182f.). Maio, 2019.

RECURRENT USE OF SAFENER AND HERBICIDE MIXTURE IN SUBDOSES INCREASE THE SURVIVAL OF *Echinochloa crus-galli*¹

Author: Carlos Alberto Gonsioriewicz Rigon
Advisor: Prof. Aldo Merotto Jr.

ABSTRACT

Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) is one of the weeds with more cases of herbicide-resistance. The factors responsible for the increased metabolism-based herbicide resistance in the species are not fully understood. The use of safeners to increase crop selectivity and herbicide mixture to broad the spectrum of weed control may favor the evolution of metabolism-based herbicide resistance. The aim of this work was to evaluate the effect of the safener isoxadifen and the fenoxaprop-p-ethyl and imazethapyr mixture as factors for the evolution of metabolism-based herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli*. The biotypes used were MOST (susceptible to fenoxaprop and imazethapyr) and CAMAQ (resistant to imazethapyr by enhanced metabolization). Initially, experiments were carried out to determine the herbicide maximum doses that provide plant survival to fenoxaprop and fenoxaprop + isoxadifen on the safener study, and fenoxaprop and imazethapyr on the herbicide mixture study. After that, selection experiments were carried out by two generations through low-doses application of the herbicide treatments described above. Dose-response curves with the selected generations G0, G2, and G2 were carried out to evaluate plant survival and growth. The resistance factor (RF) of the fenoxaprop selected G2 in relation to G0 was 2.3 and 2.2 for the biotypes MOST and CAMAQ, respectively. The RF for fenoxaprop + isoxadifen selected G2 plants in comparison with G0 increased to 3.3 and 1.8 for the MOST and CAMAQ, respectively. Selection with fenoxaprop and imazethapyr mixture provided higher tolerance in the selected G2 plants, resulting in RF of 1.6 and 3.1 for MOST and CAMAQ, respectively. Plants selected with either fenoxaprop associated with isoxadifen or with fenoxaprop and imazethapyr mixture showed increased tolerance to other herbicides, especially to cyhalofop-butyl, diclofop-methyl, and quinclorac. The CAMAQ biotype showed to be more prone to involve resistance to other herbicides. The safener isoxadifen increased plant survival and decreased the efficiency of the herbicide fenoxaprop at low-doses in the selected G2 plants. The herbicide fenoxaprop in mixture with the safener isoxadifen or with the herbicide imazethapyr in low-doses may favor the evolution of resistance to these and to other herbicides, especially in the herbicide resistant plants caused by enhanced metabolization.

¹Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (182p.). May, 2019.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral.....	4
1.2 Objetivos específicos	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Resistência de plantas daninhas	5
2.2 Mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas.....	7
2.3 Uso de protetores no aumento da seletividade das culturas aos herbicidas	10
2.4 Utilização de mistura de herbicidas para evitar a ocorrência de resistência aos herbicidas	14
2.5 Referências Bibliográficas	17
3 CAPÍTULO 1	25
3.1 Introdução	27
3.2 Material e Métodos	29
3.2.1 Material vegetal e condições de crescimento	30
3.2.2 Definição das subdoses.....	31
3.2.3 Seleção das gerações e análise da sobrevivência de G0, G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ	32
3.2.4 Curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada	34
3.2.5 Caracterização da evolução para resistência cruzada e múltipla.....	34
3.2.5.1 Caracterização da evolução da resistência cruzada ou múltipla por metabolização através de inibidores de metabolização.....	35
3.2.7 Análise dos dados.....	36
3.3 Resultados e Discussão	37
3.3.1 Definição de subdoses	37
3.3.2 Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 dos biótipos de capim-arroz.....	40
3.3.3 Curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada.....	42
3.3.4 Caracterização da evolução para resistência cruzada ou múltipla.....	50
3.3.4.1 Caracterização da evolução de resistência cruzada e múltipla por metabolização avaliada através de inibidores de enzimas P450	58
3.4 Conclusão.....	68
3.5 Referências bibliográficas.....	68

	Página
4 CAPÍTULO 2	74
4.1 Introdução	76
4.2 Material e Métodos	79
4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento	79
4.2.2 Definição das subdoses.....	80
4.2.3 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz	81
4.2.3.1 Material vegetal e extração de RNA	81
4.2.3.2 Purificação de RNA e síntese de cDNA	82
4.2.3.3 Desenho de primers para amplificação do gene ALS	82
4.2.3.5 Amplificação do gene ALS.....	83
4.2.3.6 Purificação, sequenciamento e análises das regiões do gene ALS	84
4.2.4 Avaliação do mecanismo de resistência através de inibidores de metabolização	85
4.2.5 Seleção das gerações e análise da sobrevivência da G0, G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ	85
4.2.6 Curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada.....	87
4.2.7 Caracterização da evolução da resistência a outros herbicidas	88
4.2.9 Análise dos dados.....	90
4.3 Resultados e Discussão	91
4.3.1 Definição de subdoses	91
4.3.1 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz	95
4.3.2 Avaliação da ocorrência de incremento de metabolização através de inibidores	97
4.3.3 Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ	99
4.3.4 Curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas	102
4.3.5 Caracterização da evolução da resistência a outros herbicidas.....	111
4.3.5.1 Caracterização da evolução da resistência cruzada e múltipla por metabolização avaliada através de inibidor de enzimas P450	119
4.4 Conclusões	129
4.5 Referências bibliográficas.....	130
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
6 APÊNDICES.....	138

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1 Efeito do protetor isoxadifen na evolução da resistência aos herbicidas em <i>Echinochloa crus-galli</i>	
1. Herbicidas e doses aplicadas em plantas de capim-arroz das gerações G0 e G2-selecionada com os herbicidas fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ, para a caracterização de evolução da resistência cruzada ou múltipla.....	35
2. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e massa seca da parte aérea para os biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ submetidas às diferentes doses dos herbicidas fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.....	39
3. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo MOST em relação à aplicação de subdoses do herbicida fenoxaprope associado ou não ao protetor isoxadifen.....	40
4. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de subdoses do herbicida fenoxaprope associado ou não ao protetor isoxadifen.....	41
5. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável controle visual aos 21 DAA das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionadas submetidas às diferentes doses de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.....	45
6. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada submetidas às diferentes doses de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.....	47
7. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen do biótipo MOST em relação à aplicação de herbicidas diferentes dos produtos utilizados na seleção das gerações.....	51
8. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen do biótipo CAMAQ em relação a aplicação de herbicidas diferentes dos produtos utilizados na seleção das gerações.....	52

9. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop + isoxadifen do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de quinclorac com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 60
10. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop + isoxadifen do biótipo CAMAQ submetidas às diferentes doses de quinclorac com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 63
11. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop + isoxadifen do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de diclofop com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 65
12. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop + isoxadifen do biótipo CAMAQ submetidos às diferentes doses de cialofop com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 67

CAPÍTULO 2 Efeito da mistura de herbicidas na evolução da resistência por metabolização em *Echinochloa crus-galli*.

1. Descrição dos primers utilizados para a amplificação do gene ALS dos biótipos de capim-arroz e seus respectivos tamanho de fragmento esperado e região de domínio..... 82
2. Herbicidas aplicados em plantas de capim-arroz das gerações G0 e G2 selecionada com fenoxaprop, imazetapir e fenoxaprop + imazetapir dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ, para a caracterização da evolução da resistência cruzada ou múltipla..... 89
3. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea das plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ submetidas às diferentes doses dos herbicidas fenoxaprop e imazetapir..... 93
4. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea das plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ submetidas às diferentes proporções da mistura dos herbicidas fenoxaprop e imazetapir..... 95
5. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea das plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ submetidas à aplicação prévia dos inibidores (malathion e PBO) ao herbicida imazetapir..... 99

6. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo MOST em relação à aplicação dos herbicida fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).....	100
7. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo CAMAQ em relação à aplicação dos herbicida fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).....	101
8. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável controle visual aos 21 DAA das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, imazetapir e mistura submetidas às diferentes doses de fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).....	105
9. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, imazetapir e mistura submetidas às diferentes doses de fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).....	109
10. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com a mistura dos herbicidas do biótipo MOST em relação à aplicação de outros herbicidas.....	116
11. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com a mistura dos herbicidas do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de doses de outros herbicidas.....	117
12. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de quincloraque com ou sem a aplicação de 1000 g ha ⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.....	122
13. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo CAMAQ submetidas às diferentes doses de quincloraque com ou sem a aplicação de 1000 g ha ⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.....	124
14. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de diclofope com ou sem a aplicação de 1000 g ha ⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.....	127
15. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo CAMAQ submetidas às diferentes doses de diclofope com ou sem a aplicação de 1000 g ha ⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.....	129

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1 Efeito do protetor isoxadifen na evolução da resistência aos herbicidas em *Echinochloa crus-galli*

1. Esquema representativo dos ciclos de aplicações de subdoses de cada herbicida, avaliações de sobrevivência e seleção de plantas sobreviventes para composição das gerações G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ. Para obtenção das gerações controles (G1 e G2 controle) não foi realizada a aplicação de herbicidas..... 33
2. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B), massa fresca (% do controle) (C e D) e massa seca da parte aérea (% do controle) (E e F) dos biótipos de capim-arroz MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e E) em relação à aplicação do herbicida fenoxapropo com e sem o protetor isoxadifen..... 38
3. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo MOST das plantas G0 (A, B), G2 controle (C e D) e G2 selecionada com fenoxapropo (E) e G2 selecionada com fenoxapropo + isoxadifen (F) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxapropo (A, C e E) e fenoxapropo + isoxadifen (B, D e F). Fotos aos 21 DAA..... 42
4. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo CAMAQ das plantas G0 (A, B), G2 controle (C e D) e G2 selecionada com fenoxapropo (E) e G2 selecionada com fenoxapropo + isoxadifen (F) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxapropo (A, C e E) e fenoxapropo + isoxadifen (B, D e F). Fotos aos 21 DAA..... 43
5. Controle visual aos 21 DAA (%) das plantas das gerações de seleções dos biótipos de capim-arroz MOST (A e B) e CAMAQ (C e D) em relação à aplicação do herbicida fenoxapropo (A e C) e fenoxapropo + isoxadifen (B e D). 44
6. Massa fresca da parte aérea (% do controle) das plantas das gerações de seleções dos biótipos de capim-arroz MOST (A e B) e CAMAQ (C e D) em relação à aplicação do herbicida fenoxapropo (A e C) e fenoxapropo + isoxadifen (B e D)..... 46
7. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 17,25 e 20g de fenoxapropo para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropo; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropo + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropo; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropo + isoxadifen..... 54

8. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 17,25g e 20g de fenoxaprove + isoxadifen para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen..... 54
9. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14 DAA em relação à aplicação de 298g de diclofope para os biótipos MOST e CAMAQ. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen..... 56
10. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14 DAA em relação à aplicação de 57 g de cialofope para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen..... 56
11. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14 DAA em relação à aplicação de 262,5g e 375g de quincloraque para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen..... 57
12. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprove e G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida quincloraque sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion..... 59
13. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprove e G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen do biótipo CAMAQ em relação à aplicação do herbicida quincloraque sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion..... 62
14. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprove e G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida diclofope sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion..... 64
15. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprove e G2 selecionada com fenoxaprove + isoxadifen do biótipo CAMAQ em relação à aplicação do herbicida cialofope sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion..... 66

CAPÍTULO 2 Efeito da mistura de herbicidas na evolução da resistência por metabolização em *Echinochloa crus-galli*.

1. Representação esquemática do gene ALS de capim-arroz com as regiões de domínio (C, A, D, F, B e E) e os respectivos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos fragmentos. Faixas pretas indicam as oito posições da enzima conhecidas em causar resistências aos herbicidas inibidores da ALS pela substituição de aminoácidos.....	83
2. Esquema representativo dos ciclos de aplicações de subdoses de cada herbicida, avaliações da sobrevivência e seleção de plantas sobreviventes para composição das gerações G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ. Para obtenção das gerações controles (G1 e G2 controle) não foi realizada a aplicação de herbicidas.....	87
3. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B), massa fresca (% do controle) (C e D) e massa seca da parte aérea (% do controle) (E e F) dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ em resposta à aplicação dos herbicidas fenoxaprope (A, C e E) e imazetapir (B, D e F).....	92
4. Controle visual aos 21 DAA (%) (A, B e C), massa fresca (% do controle) (D, E e F) e massa seca da parte aérea (G, H e I) dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ em resposta à aplicação da associação dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir em diferentes proporções: 75% de fenoxaprope + 25% de imazetapir (A, D e G); 50% de fenoxaprope + 50% de imazetapir (B, E e H) e 25% de fenoxaprope + 75% de imazetapir (C, F e I).....	94
5. Produto da amplificação dos primers ALS1 (b), ALS2 (c), ALS3(d), ALS4(e), ALS5(f) e ALS6 (g) do gene ALS dos biótipos MOST e CAMAQ, separados por gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb foi utilizado (a).....	96
6. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B), massa fresca (% do controle) (C e D) e massa seca da parte aérea (% do controle) (E e F) dos biótipos de capim-arroz MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em resposta à aplicação de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO) 2 horas antes da aspensão do herbicida imazetapir.....	98
7. Controle visual aos 21 DAA (%) das gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas de capim-arroz do biótipo MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprope (A e B), imazetapir (C e D) e mistura (fenoxaprope + imazetapir) (E e F).....	103
8. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo MOST-G0 (A, B, C), G2 controle (D, E e F) e G2 selecionada com fenoxaprope (G), imazetapir (H) e mistura (I) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprope (A, D e G), imazetapir (B, E e H) e mistura (fenoxaprope + imazetapir) (C, F e I). Fotos aos 21 DAA.....	104
9. Massa fresca da parte aérea (% do controle) das gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas de capim-arroz do biótipo MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprope (A e B), imazetapir (C e D) e mistura (fenoxaprope + imazetapir) (E e F).....	106

10. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo CAMAQ-G0 (A, B, C), G2 controle (D, E e F) e G2 selecionada com fenoxaprop (G), imazetapir (H) e mistura (I) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprop (A, D e G), imazetapir (B, E e H) e mistura (fenoxaprop + imazetapir) (C, F e I). Fotos aos 21 DAA..... 108
11. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 17,25 e 20g de fenoxaprop nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura..... 112
12. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 20 e 200g de imazetapir nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura..... 112
13. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 6,9 + 30 e 34,5 +100g de fenoxaprop + imazetapir nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura..... 114
- 14 Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 298g de diclofop nos biótipos MOST e CAMAQ. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura..... 114
15. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 262,5 e 375g de quincloraque nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura..... 115

16. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida quincloraque sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 121
17. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo CAMAQ em relação à aplicação do herbicida quincloraque sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 123
18. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida diclofope sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 126
19. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo CAMAQ em relação a aplicação do herbicida diclofope sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida..... 128

1 INTRODUÇÃO

A presença de plantas daninhas em lavouras é um dos principais fatores bióticos com potencial de reduzir a produtividade agrícola (Oerke, 2006). O uso de herbicidas é o principal e mais utilizado manejo para o controle de plantas daninhas (Ruegg *et al.*, 2007). No entanto, a aplicação recorrente de herbicidas tem resultado na seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a estes produtos (Powles e Yu, 2010; Tehranchian *et al.*, 2017). A evolução da resistência aos herbicidas é determinada pela frequência de uso destes produtos e também pelas características biológicas e genéticas das plantas daninhas (Neve e Powles, 2005b). Os mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas são principalmente relacionados à mutação no gene que codifica a enzima alvo, superexpressão do gene, menor absorção, padrão alterado de translocação, sequestro no vacúolo ou metabolização da molécula herbicida (Gaines *et al.*, 2010; Powles e Yu, 2010; Ghanizadeh e Harrington, 2017a).

O mecanismo de metabolização envolve a detoxificação da molécula herbicida pelas plantas através de enzimas detoxificadoras como, principalmente, citocromo P450 monooxigenase (P450), glutationa S-transferase (GST) e glicosiltransferases (GT) (Powles e Yu, 2010; Duhoux *et al.*, 2017a). A metabolização de herbicidas associada à resistência é menos compreendida que os demais mecanismos, e é considerada de maior importância por ser responsável pelo crescente número de espécies de plantas daninhas resistentes a vários grupos de herbicidas com diferentes mecanismos de ação (Petit *et al.*, 2010; Powles e Yu, 2010; Heap, 2017). As enzimas envolvidas na detoxificação de herbicidas são capazes de metabolizar as moléculas dos herbicidas inibidores da acetolactato sintetase (ALS) e Acetil coenzima A carboxilase (ACCase), podendo em alguns casos conferir resistência múltipla em biótipos das espécies *Echinochloa phyllopogon* e *Lolium rigidum* (Gaines *et al.*, 2014; Iwakami *et al.*, 2014b; Ghanizadeh e Harrington, 2017a).

A utilização de subdoses com o objetivo de diminuir o custo do herbicida vem sendo associada ao favorecimento da evolução da resistência aos herbicidas (Tehranchian *et al.*, 2017). Por outro lado, outros fatores como aplicações em condições ambientais inadequadas,

deficiente cobertura e também momento inadequado de aplicação resultam na ocorrência de subdoses e contribuem para a evolução da resistência a herbicidas. A aplicação recorrente de doses menores que a recomendada resulta na seleção de indivíduos que apresentam menor sensibilidade ao herbicida (Neve e Powles, 2005a). Com apenas três ciclos de aplicação de subdoses de diclofop-metil e dicamba, plantas suscetíveis de *Lolium rigidum* e *Amaranthus palmeri*, respectivamente, apresentaram aumento na sobrevivência ao herbicida devido ao acúmulo de alelos relacionados a enzimas detoxificadoras (Neve e Powles, 2005b; Busi *et al.*, 2013; Ashworth *et al.*, 2016; Tehranchian *et al.*, 2017). Após quatro gerações de aplicação de subdoses de 2,4 D em plantas suscetíveis de *Raphanus raphanistrum*, suas progênies mostraram-se menos sensíveis a este herbicida e também aos herbicidas inibidores da ALS como chlorsulfuron (Ashworth *et al.*, 2016). De maneira similar, isso também foi verificado com o herbicida glifosato, em que populações de *Alopecurus myosuroides* suscetíveis ao herbicida, após dois ciclos de seleção utilizando subdoses, apresentaram significativa redução no controle pelo herbicida, aumentando significativamente o fator de resistência de 1,2 para 1,5 (Davies e Neve, 2017). Esses resultados afirmam que a variabilidade na sensibilidade das plantas daninhas aos herbicidas pode estar relacionada ao acúmulo de alelos que tenham capacidade de modificar a fisiologia nas progênies e torná-las menos sensíveis aos herbicidas (Delye, 2013). Esses fatores, juntamente com a não rotação de mecanismos de ação de herbicidas, apresentam papel importante na seleção de biótipos resistentes aos herbicidas por detoxificação, sendo mais dificultado o controle destas quando a resistência seja múltipla.

Outro fator que pode estar associado na evolução da resistência por metabolização é o uso de protetores. Protetores são compostos químicos associados aos herbicidas que protegem a cultura contra a fitotoxicidade causada pelo herbicida, aumentando a seletividade (Riechers *et al.*, 2010; Rosinger e Shulte, 2019). Teoricamente, esses produtos quando associados aos herbicidas não afetam negativamente o controle das plantas daninhas (Riechers *et al.*, 2010). Esses compostos são aplicados tanto como tratamento de sementes ou associados na formulação do herbicida (Riechers *et al.*, 2010). Em geral, estes compostos reduzem a fitotoxicidade do herbicida através do aumento da metabolização do herbicida pela cultura (Hatzios, 1983; Rosinger, 2014). Isso ocorre devido aos protetores ativarem genes codificantes de enzimas envolvidas no processo de defesa e detoxificação da planta, como as enzimas do citocromo P450, GST, GT e também de proteínas transportadoras ABC (Powles e Yu, 2010; Riechers *et al.*, 2010; Duhoux *et al.*, 2017b). Esse aumento da expressão de genes detoxificantes que ocorre a partir da aplicação dos protetores é similar com o que ocorre em plantas daninhas resistentes aos herbicidas pelo mecanismo não relacionado ao

local de ação dos herbicidas (N-RELA) (Yuan *et al.*, 2007). Alguns trabalhos têm reportado o efeito de protetores na expressão de genes detoxificantes em plantas daninhas em aspersões únicas (Cummins *et al.*, 2009; Elmore *et al.*, 2016; Duhoux *et al.*, 2017b). No entanto, não é conhecido o efeito do uso recorrente de protetores em uma população de plantas daninhas. A aplicação de herbicidas associados com protetores pode estar favorecendo a maior expressão de genes de detoxificação em plantas daninhas, e assim potencializando a evolução da resistência N-RELA devido a maior capacidade de metabolização da molécula herbicida nas suas progênies. O efeito potencial de protetores na evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas não tem sido abordado na literatura.

A prática de manejo mais utilizada para a prevenção da ocorrência ou surgimento da resistência de plantas daninhas aos herbicidas é a aplicação sequencial ou mistura de herbicidas de diferentes mecanismos de ação (Zhang *et al.*, 1995; Matzenbacher *et al.*, 2015b). A utilização da mistura de herbicidas objetiva aumentar o espectro de controle, diminuir o custo de produção e ainda, prevenir o desenvolvimento de biótipos resistentes aos herbicidas (Abendroth *et al.*, 2011). Os efeitos da interação entre herbicidas podem apresentar efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos, caso o efeito da combinação for maior, menor ou igual à soma dos efeitos dos herbicidas aplicados isoladamente, respectivamente (Zhang *et al.*, 1995). Para caracterizar a atividade de uma mistura de herbicidas são utilizados modelos matemáticos de referência que predizem a resposta das plantas à mistura de herbicidas (Abendroth *et al.*, 2011; Sobyte *et al.*, 2011). Deste modo, busca-se misturas de herbicidas que resultem em efeitos sinérgicos, em que doses menores em relação a recomendada terão mesmo ou melhor resultado do que se pulverizadas isoladamente nas doses recomendadas (Cedergreen *et al.*, 2008).

A utilização da mistura de herbicidas é muito comum na maioria das propriedades do Brasil (Gazziero, 2015). No entanto, essa prática ocorre sem acompanhamento, conhecimento prévio ou recomendações técnicas sobre as doses e características dos produtos (Gazziero, 2015; Matzenbacher *et al.*, 2015b). A simples prática da mistura de dois herbicidas de diferentes mecanismos de ação poderá não ser eficiente e resultar em efeito antagônico na maioria dos casos (Zhang *et al.*, 1995). No entanto, o efeito da mistura de herbicidas, independentemente de seu efeito sinérgico ou antagônico, pode estar favorecendo a evolução da resistência. Esse processo pode ocorrer devido ao uso de doses menores que a recomendada quando se utiliza a mistura de herbicidas, pela interação dos produtos ou mesmo por fatores de aspersão inadequada ou fatores ambientais que resultem em interceptação pelas plantas daninhas de subdoses dos herbicidas aplicados. Plantas sobreviventes ao efeito das misturas, após gerações, podem acumular alelos de genes

detoxificantes de herbicidas em suas progênes, diminuindo assim a sensibilidade ao herbicida. Ainda, o efeito de um dos herbicidas da mistura pode estar favorecendo a expressão de genes detoxificantes com capacidade de metabolizar o outro produto da mistura. A maioria das pesquisas existentes atualmente em nível molecular e fisiológico estão voltadas para determinar o efeito direto das misturas, e inexistem estudos voltados para o entendimento dessas sobre evolução da resistência aos herbicidas por metabolização.

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do protetor isoxadifen e da mistura de herbicidas como fatores que favorecem a evolução da resistência aos herbicidas fenoxaprope-p-etílico (inibidor da enzima ACCase) e imazetapir (inibidor da enzima ALS).

1.2 Objetivos específicos

- i) Avaliar o efeito da aplicação recorrente de subdoses do herbicida fenoxaprope-p-etílico associado ao protetor isoxadifen na evolução da resistência a este herbicida em biótipos de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*);
- ii) Determinar o efeito da seleção de plantas de capim-arroz através do uso de subdoses da mistura de fenoxaprope-p-etílico + imazetapir na evolução da resistência aos herbicidas;
- iii) Identificar potencial para evolução da resistência cruzada e múltipla através da aplicação de herbicidas de outros mecanismos de ação nas plantas de capim-arroz selecionadas tanto com fenoxaprope-p-etílico associado com o protetor isoxadifen, como também as gerações selecionadas com mistura;
- iv) Caracterizar a evolução da resistência cruzada ou múltipla por metabolização através da aplicação de inibidor de enzimas citocromo P450.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resistência de plantas daninhas

A presença de plantas daninhas restringe a produção de grãos devido à competição por água, luz e nutrientes (Van Gaelen *et al.*, 2016). O controle das invasoras é um dos principais fatores que aumentam o custo de produção de lavouras comerciais (Gressel, 2011). A utilização de herbicidas é a principal forma de controle de plantas daninhas empregadas atualmente. Recentemente, a utilização de culturas tolerantes a herbicidas ocasionou grande impacto na agricultura. Essa tecnologia proporcionou o uso de herbicidas não seletivos, principalmente o glifosato, promovendo o controle das plantas daninhas (Brookes e Barfoot, 2016). A utilização de herbicidas e o uso de culturas transgênicas tiveram tanto sucesso que, por décadas, poucas indústrias químicas e mesmo cientistas buscaram o desenvolvimento de novos herbicidas com novos mecanismos de ação (Gressel, 2011; Clark, 2012). Impacto similar ocorreu com a utilização de herbicidas imidazolinonas associados a cultivares tolerantes para o controle de arroz vermelho na cultura do arroz irrigado. No entanto, a aplicação contínua de herbicidas contribuiu para o aumento da pressão de seleção facilitando a evolução da resistência a estes produtos (Powles e Yu, 2010; Norsworthy *et al.*, 2012). Esse problema vem causando grande impacto na agricultura devido ao aumento dos custos de produção e até mesmo limitando a utilização de diversas áreas (Gerhards *et al.*, 2016).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas ocorre quando uma planta apresenta capacidade de sobreviver e se reproduzir após exposição à dose recomendada de herbicida que normalmente é letal à espécie (WSSA, 1994). Na maioria dos casos, a resistência pode ocorrer naturalmente devido às mutações de ponto que ocorrem de forma aleatória dentro de uma população de plantas que modificam a estrutura da enzima alvo (Yu e Powles, 2014). Nesta população, a aplicação de herbicida controla as plantas suscetíveis e seleciona as plantas que apresentam o local de ação alterado, ocasionando a pressão de seleção com o uso seguido de herbicidas com mesmo mecanismo de ação (Owen e Zelaya, 2005). Para comprovar a resistência do biótipo de planta daninha que foi selecionado com a aplicação

em nível de campo é utilizado o método clássico de curva de dose-resposta, que fornece o nível de resistência do biótipo resistente em relação ao suscetível (Burgos *et al.*, 2013).

Os primeiros casos de resistência aos herbicidas foram relatados aos herbicidas mimetizadores de auxina em biótipo da espécie *Daucus carota* em 1957 (Switzer, 1957; Heap, 2019). No entanto, foi somente no início dos anos 70 que os problemas de resistência aos herbicidas causaram maior impacto, principalmente na cultura do milho, e foram associados aos herbicidas inibidores do FSII (Heap, 2019). Atualmente foram relatados 498 casos de plantas daninhas resistentes a praticamente todos os mecanismos de ação disponíveis (Heap, 2019). Entre os principais grupos de herbicidas que apresentam maiores números de espécies de plantas resistentes destacam-se os inibidores da ALS, com 160 casos, seguido das triazinas, com 74 casos e os inibidores da ACCase, com 48 casos (Heap, 2019). No Brasil, 50 casos de plantas com resistência foram relatadas até o momento, abrangendo 29 espécies diferentes de plantas daninhas (Heap, 2019). Além do número de plantas resistentes, cresce o número de plantas que apresentam resistência múltipla aos herbicidas, ou seja, que são resistentes a dois ou mais mecanismos de ação, conferindo maior dificuldade no seu controle devido ao menor número de mecanismos de ação disponíveis (Petit *et al.*, 2010). A resistência ocorre em mais de 250 espécies de plantas daninhas em todo o mundo (Heap, 2019). A espécie que apresenta maior importância é *Lolium rigidum* pela existência de biótipos resistentes a 12 mecanismos de ação diferentes (Heap, 2019). Além desta espécie, destacam-se as espécies encontradas no Brasil como *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*, *Eleusine indica*, *Lolium multiflorum* e *Echinochloa colona*, apresentando biótipos resistentes a dez, oito, oito e sete mecanismos de ação distintos, respectivamente (Heap, 2019).

Vários são os fatores que podem favorecer as plantas daninhas para evolução da resistência aos herbicidas. O tamanho da população, taxa de mutação, pressão de seleção imposta pelo herbicida e a dominância da resistência são fatores principais que determinam a probabilidade de evolução da resistência pelas plantas (Kreiner *et al.*, 2018). No entanto, fatores como fluxo gênico, uso de subdoses e, características da planta como variação genética pré-existente e tipo de fecundação também influenciam na velocidade de seleção de biótipos resistentes (Neve e Powles, 2005b; Kreiner *et al.*, 2018). Apesar da utilização de manejos recomendados para mitigar a resistência como a rotação de mecanismos de ação de herbicidas, essa prática pode não reduzir a seleção de biótipos com essa característica (Hicks *et al.*, 2018). Com o cenário atual, evidências sugerem que a evolução da resistência em plantas daninhas vai superar a capacidade das indústrias de substituir produtos químicos que não terão mais eficiência no controle, como já ocorre em muitos casos (Gould *et al.*, 2018).

Para tanto, avanços científicos estão sendo realizados através de técnicas como genômica, transcriptômica e metabolômica para aprofundar o entendimento da resistência em plantas daninhas (Maroli *et al.*, 2018).

2.2 Mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas

Os mecanismos de resistência das plantas daninhas são divididos em dois grupos: mecanismos relacionados ao local de ação (RELA) e mecanismos não relacionados ao local de ação (N-RELA) do herbicida (Yuan *et al.*, 2007; Yu e Powles, 2014). Resistência RELA ocorre principalmente devido a uma mutação na enzima alvo, ou seja, uma troca na sequência de aminoácidos que confere uma modificação estrutural na enzima, que diminuiu sua afinidade pela molécula herbicida (Yu e Powles, 2014). Esse mecanismo de resistência também é chamado de monogênico, pois é resultado da alteração em apenas um gene codificante (Beckie e Tardif, 2012). A resistência RELA pode ser conferida também devido à super-expressão da enzima alvo, à amplificação do gene ou modificações no promotor. (Powles e Yu, 2010; Yu e Powles, 2014; Laforest *et al.*, 2017). Recentemente foi identificado que um pequeno DNA circular extracromossômico pode ser responsável pela amplificação do gene EPSPS, causando resistência ao glifosato em *Amaranthus palmeri* (Koo *et al.*, 2018). O mecanismo de resistência devido à mutação no gene codificante da enzima alvo é bastante conhecido e frequentemente relatado para espécies resistentes, principalmente aos herbicidas inibidores da enzima ACCase e ALS (Zhou *et al.*, 2007; Powles e Yu, 2010; Bi *et al.*, 2016).

A resistência por mutação aos herbicidas inibidores da ACCase ocorre usualmente devido à mutação de ponto no domínio carboxil transferase (CT) da enzima ACCase (Bi *et al.*, 2016). Substituições de aminoácidos em sete sítios do gene ACCase já foram reportados e causam resistência nas espécies gramíneas a esse grupo de herbicidas (Zhang e Powles, 2006; Powles e Yu, 2010). A resistência aos herbicidas inibidores da ALS por mutação ocorre devido a pelo menos uma mutação de ponto no gene ALS que terá a estrutura tridimensional da enzima modificada e isso torna a enzima insensível à molécula herbicida (McCourt *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2017). Mais de 166 espécies de plantas daninhas já foram reportadas apresentando resistência a esse mecanismo de ação devido a 26 substituições diferentes de aminoácidos em 8 sítios do gene (Tranel e Wright, 2002; Powles e Yu, 2010). Dentre estas posições, a mutação na posição P197 é tão comum de se encontrar em uma população resistente de plantas daninhas que novas moléculas herbicidas estão sendo desenvolvidos para controlar indivíduos que apresentam essa mutação (Qu *et al.*, 2017).

O mecanismo de resistência N-RELA é mais complexo que a resistência RELA, pois envolve um ou vários mecanismos que limitam a molécula do herbicida a atingir a enzima alvo (Yu e Powles, 2014). Dentre estes mecanismos, destacam-se a maior capacidade da planta em degradar diferentes moléculas de herbicida, maior expressão do gene codificante da enzima alvo, aumento do sequestro no vacúolo, diminuição da absorção e translocação do herbicida na planta e também rápida necrose (Yu e Powles, 2014; Duhoux *et al.*, 2017a; Ghanizadeh e Harrington, 2017a; Laforest *et al.*, 2017; Harre *et al.*, 2018). Esse tipo de mecanismo de resistência, além de ser mais complexo por ser resultado multigênico, tem potencial de conferir resistência a herbicidas de diferentes mecanismos de ação e a herbicidas nunca antes usados na lavoura (Preston, 2004; Han *et al.*, 2013; Yu e Powles, 2014). A evolução para esse tipo de resistência pode ser causada por fatores de estresse como o uso de subdoses que podem causar estresse fisiológico na planta resultando modificações a níveis de transcritos e proteínas (Dyer, 2018).

A resistência N-RELA causada pelo aumento da metabolização do herbicida, em geral, envolve uma fase de ativação e outra de conjugação (Ghanizadeh e Harrington, 2017a). Na fase de ativação ocorre a hidrólise ou oxidação da molécula herbicida mediada principalmente por enzimas do citocromo P450 monooxigenase (P450) (Nandula *et al.*, 2019). As enzimas P450 catalisam várias reações, sugerindo grande papel na evolução da resistência de plantas daninhas (Yuan *et al.*, 2007). Essas enzimas estão presentes em vários organismos, como animais, fungos e bactérias, mas se apresentam em maior variedade em plantas e com características de serem muito específicas aos seus substratos (Siminszky, 2006). Em plantas daninhas resistentes, as P450 agem através da hidroxilação ou desalquilação pela adição de um átomo de oxigênio na molécula de herbicida utilizando elétrons a partir do NADPH (Powles e Yu, 2010). Após essa modificação da molécula de herbicida, essa pode passar pela fase de conjugação (Ghanizadeh e Harrington, 2017a). Nessa fase a molécula de herbicida pode ser conjugada com substratos como açúcar, aminoácidos ou glutathione a partir das enzimas glutathione S-transferase (GST) e glicosiltransferase (GT) e ainda ser transportada para o vacúolo, tornando-a ainda menos tóxica à planta (Yuan *et al.*, 2007; Powles e Yu, 2010; Duhoux *et al.*, 2017a; Ghanizadeh e Harrington, 2017a).

Todas essas enzimas, P450, GST e GT têm sido sugeridas em desempenhar papel crucial no metabolismo de herbicidas em plantas daninhas (Cummins *et al.*, 2013; Iwakami *et al.*, 2014b; Duhoux *et al.*, 2017b). Esse mecanismo de resistência tem sido relatado em grande número de casos em espécies de plantas daninhas monocotiledôneas como *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides* e *Echinochloa* spp. (Busi *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2017;

Iwakami *et al.*, 2019). No entanto, espécies dicotiledôneas como *Amaranthus tuberculatus* e *Amaranthus palmeri* têm envolvido resistência a herbicidas de diferentes mecanismos de ação através da maior metabolização (Nakka *et al.*, 2017; Figueiredo *et al.*, 2018). Esse mecanismo de metabolização dos herbicidas também ocorre em culturas como arroz, trigo e milho, as quais toleram herbicidas devido à ação de P450 e GST na detoxificação das moléculas dos produtos, tornando-os seletivos (Werck-Reichhart *et al.*, 2000; Powles e Yu, 2010; Saika *et al.*, 2014).

O aumento da metabolização de herbicidas pelas enzimas detoxificantes ocorre em várias espécies de plantas daninhas. O crescente número de espécies com esse mecanismo de resistência causa grande preocupação, ameaçando a eficácia dos herbicidas devido ao potencial das plantas em metabolizar produtos de diferentes mecanismos de ação (Yu e Powles, 2014). Enzimas P450 e GST estão envolvidas na maior capacidade de metabolização de herbicidas ACCase e ALS em biótipos resistentes de *Lolium rigidum* e *Alopecurus myosuroides* (Preston *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2009; Cummins *et al.*, 2013). A enzima GT e proteínas transportadoras ABC também estão associadas ao aumento da metabolização de herbicidas inibidores de ACCase e ALS em espécies de *Lolium* sp. (Gaines *et al.*, 2014; Yu e Powles, 2014; Duhoux *et al.*, 2017a). Além disso, enzimas P450s foram relatadas como responsáveis pelo rápido desenvolvimento da resistência por metabolização em biótipo suscetível de *L. rigidum* a partir de apenas três aplicações recorrentes de diclofop-metil (Yu *et al.*, 2013). Isso está relacionado à capacidade de acúmulo de alelos de genes de detoxificação que causam modificações fisiológicas nas progênes em cada geração, tornando-as menos sensíveis aos herbicidas (Delye, 2013; Ghanizadeh e Harrington, 2017b).

A resistência aos herbicidas através da metabolização também tem ocorrido com grande importância em capim-arroz (*Echinochloa* sp.) (Iwakami *et al.*, 2014b; Song *et al.*, 2017). No sul do Brasil, com o uso intenso de herbicidas do grupo das imidazolinonas em lavouras de arroz, diferentes biótipos de *Echinochloa crus-galli* foram encontrados apresentando resistência após poucos anos de aplicação do herbicida, em geral associados à utilização da tecnologia do arroz Clearfield® (Matzenbacher *et al.*, 2015a). Em algumas populações resistentes, a maior metabolização do herbicida foi a responsável pela maior sobrevivência das plantas, comprovado com a utilização de inibidores de P450, como PBO, ABT e Malathion, os quais reverteram o fator de resistência de aproximadamente 46, 12 e sete para 18, dois e dois, respectivamente para três biótipos de capim-arroz (Matzenbacher *et al.*, 2015a). A resistência por metabolização destes biótipos de capim-arroz a esse grupo de herbicidas pode estar associada à maior expressão de genes codificantes de enzimas detoxificadoras, como os genes *CYP81A6* e *GSTF1* (Dalazen *et al.*, 2018a; Dalazen *et al.*,

2018b). Outros genes como *CYP81A12* e *CYP81A21* foram identificados e caracterizados como sendo responsáveis pela de-metilação de moléculas dos herbicidas inibidores da ALS bensulfuron e penoxsulam em *E. phylloponon* (Iwakami *et al.*, 2014a). Recentemente, estes mesmos genes foram identificados sendo capazes de hidroxilar moléculas de herbicidas inibidores da enzima ACCase como diclofope, tralkoxidim e pinoxadem em plantas de arroz transformadas (Iwakami *et al.*, 2019). A presença no genoma de grande número de genes relacionados a detoxificação como em *E. crus-galli* pode estar associada com a maior capacidade de evoluir para resistência por metabolização (Guo *et al.*, 2017). No entanto, a regulação com que as plantas daninhas desenvolvem a maior capacidade de metabolizar os herbicidas ainda é tema para muitas pesquisas, embora muito pouco seja entendido tanto a nível molecular como fisiológico (Ghanizadeh e Harrington, 2017b; Nandula *et al.*, 2019).

Apesar de serem dois tipos de mecanismos de resistência distintos aos herbicidas, a resistência RELA e N-RELA já foram identificadas em mesma planta, dificultando ainda mais o controle desses biótipos. Plantas de *Alopecurus japonicus* resistentes ao herbicida fenoxaprope-p-etílico foram identificadas possuindo mutação no domínio CT do gene ACCase conferindo substituição de Asp2078 para Gli2078 e maior expressão de três genes da subfamília CYP72A e um gene da subfamília CYP81A (Chen *et al.*, 2018). Ainda, a resistência N-RELA pode ser regulada devido a mutações no gene que codifica enzimas de detoxificação (Wright *et al.*, 2018). Mutações de ponto nos genes do citocromo P450 foram identificadas e caracterizadas como responsáveis pela resistência múltipla em plantas de *E. colona* com resistência aos herbicidas imazamox, fenoxaprope-p-etílico, quincloraque e propanil (Wright *et al.*, 2018). Essas características de resistência aos herbicidas encontradas cada vez mais em plantas daninhas demonstram que o manejo destas será cada vez mais difícil e a busca pelo entendimento dos fatores que favorecem a evolução da resistência é cada vez mais relevante.

2.3 Uso de protetores no aumento da seletividade das culturas aos herbicidas

Protetores, também conhecidos como *safeners* ou antídotos, por definição são compostos químicos que protegem as culturas das injúrias causadas pelos herbicidas, sem afetar negativamente o controle das plantas daninhas (Rosinger e Shulte, 2019). Devido à baixa descoberta e desenvolvimento de novas moléculas herbicidas, o uso de protetores tem ganhado importância para melhorar a seletividade das culturas (Nandula *et al.*, 2019). Esses compostos são aplicados no tratamento de sementes ou juntamente com o herbicida aplicado ao solo ou em pós-emergência (Riechers *et al.*, 2010). Os protetores apresentam

propriedades físico-químicas bastante similares aos herbicidas, permitindo assim boa absorção pelas plantas (Rosinger *et al.*, 2012). Nas formulações, a relação de protetor e herbicida varia geralmente entre 1:4 até 1:6, respectivamente, demonstrando que é necessária pouca dose do protetor para apresentar efeito satisfatório (Hatzios e Burgos, 2004). Embora a maioria dos herbicidas tenham sido desenvolvidos sem o uso de protetores devido à seletividade natural das culturas, o sucesso da utilização de protetores no manejo de plantas daninhas ocorre por esses compostos químicos promoverem seletividade do herbicida em certas culturas, sem comprometer o controle das plantas daninhas que, morfológicamente e fisiologicamente, são semelhantes à cultura (Rosinger, 2014). No entanto, esses compostos químicos são bastante específicos, protegendo principalmente certas culturas monocotiledôneas contra a injúria de herbicidas específicos (Hatzios e Burgos, 2004; Kraehmer *et al.*, 2014).

O uso de protetores teve início em 1947 com a observação de Otto Hoffmann em plantas de tomates que, quando tratadas com 2,4,6-triclorofenoxyacetico, não sofreram injúria pelo herbicida 2,4 D (Rosinger e Shulte, 2019). A partir disso, várias investigações foram direcionadas a estes compostos que apresentavam potencial de proteção às culturas até a produção do primeiro protetor comercial, o 1,8 anidrido naftálico usado inicialmente como tratamento de sementes na proteção de milho aos herbicidas tiocarbamatos (Hatzios e Burgos, 2004). Apesar desses compostos serem descobertos há vários anos, fatores como o aumento do número de espécies de plantas daninhas resistentes aos herbicidas e o não surgimento de novos mecanismos de ação, fazem com que o uso de protetores no manejo de plantas daninhas seja promissor para o aumento do espectro de controle e no aumento da seletividade dos herbicidas às culturas (Duke e Dayan, 2015; Lindell *et al.*, 2015; Jeschke, 2016).

Os protetores são usados atualmente, na sua maioria, associados com herbicidas inibidores da enzima ACCase, ALS e também, com inibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) (Ahrens *et al.*, 2013). Vários herbicidas disponíveis comercialmente possuem protetores nas suas formulações para culturas monocotiledôneas (Jeschke, 2016). O protetor deve agir de forma mais rápida antes do herbicida causar fitotoxicidade na cultura (Rosinger e Shulte, 2019). O herbicida S-metolaclor é seletivo ao milho devido à sua formulação conter o protetor benoxacor (Rosinger *et al.*, 2012). O protetor dichlormid assegura a seletividade à cultura do herbicida acetochlor (Rosinger, 2014). O herbicida halosulfurom-metil usado em pré e pós-emergência no milho e sorgo apresenta seletividade devido ao protetor furilazole associado na formulação (Rosinger e Shulte, 2019). Na cultura do trigo e cevada a seletividade aos herbicidas clodinafope-propargil (Topik®) e ao

pinoxaden (Axial®) ocorre devido a presença do protetor cloquintocet-mexyl (Jeschke, 2016). O mesmo protetor promove a seletividade dos herbicidas pyroxsulam e halauxifen nos cereais de inverno (Jeschke, 2016). Outro protetor usado para aumentar a seletividade de culturas de inverno é o mefenpir-dietil associado com o herbicida fenoxaprop-p-etílico (Puma S®) e iodosulfuron-metil-sódico (Hussar®) (Rosinger *et al.*, 2012; Ahrens *et al.*, 2013).

O protetor isoxadifen-etílico associado aos herbicidas foramsulfuron (Option®) e na mistura de foramsulfuron mais iodosulfuron-metil-sódico (Equip®) promove proteção à cultura do milho (Rosinger *et al.*, 2012). O mesmo protetor é usado na associação com fenoxaprop-p-etílico (Ricestar®, Starice®) para a cultura do arroz (Rosinger e Shulte, 2019). Para a cultura do milho, a maior seletividade do herbicida tembotriona ocorre pela sua formulação com isoxadifen-p-etílico (Rosinger e Shulte, 2019). Recentemente, herbicidas como dicamba, nicosulfuron e rimsulfuron foram formulados com o protetor isoxadifen-p-etílico para reduzir injúrias nos cereais de inverno (Rosinger e Shulte, 2019). O protetor descoberto mais recentemente e comercializado é o cyprosulfamide (Rosinger e Shulte, 2019). Esta molécula foi descoberto pela empresa Bayer Cropscience e assegura a proteção da cultura do milho ao herbicida tiencarbazone-metil + isoxaflutole, tanto pela absorção via radicular como foliar (Jeschke, 2016). Assim, a maioria dos protetores são utilizados em culturas monocotiledôneas, existindo apenas a disponibilidade do dietholate que protege a cultura do algodão e arroz via tratamento de sementes para o uso do herbicida clomazone, sendo o único protetor relacionado com cultura dicotiledônea, apesar de grandes esforços das indústrias químicas (Sanchotene *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2015; Jeschke, 2016).

Os protetores reduzem a fitotoxicidade através do aumento da metabolização do herbicida pela cultura (Hatzios, 1983; Rosinger, 2014; Duhoux *et al.*, 2017b). Esse aumento metabólico ocorre pela ativação de genes que codificam enzimas envolvidas na defesa e na detoxificação da planta, como por exemplo, as do citocromo P450, GST, GT e também proteínas transportadoras ABC (Powles e Yu, 2010; Riechers *et al.*, 2010; Duhoux *et al.*, 2017b). Todas as moléculas de protetores estudadas até o momento influenciam apenas a taxa de metabolização das moléculas dos herbicidas e não a rota metabólica desses (Rosinger e Shulte, 2019). Esse aumento da expressão de genes detoxificantes que ocorre a partir da aplicação dos protetores é similar com o que ocorre em plantas daninhas resistentes aos herbicidas pelo mecanismo N-RELA (Yuan *et al.*, 2007). Entre os diferentes mecanismos N-RELA que causam a resistência em plantas daninhas, o aumento da metabolização dos herbicidas por enzimas detoxificantes é o mais importante e o que causa maior preocupação devido aos problemas já mencionados (Gaines *et al.*, 2014; Yu e Powles, 2014).

Embora os protetores sejam comercializados a mais de 40 anos, o mecanismo de sinalização destes aos genes de metabolização na planta ainda é pouco entendido (Nandula *et al.*, 2019). Alguns trabalhos indicam que os protetores interferem a nível de transcrição, agindo com uma sinalização pré-existente na resposta de defesa na planta (Rosinger e Shulte, 2019). Vários genes detoxificantes das famílias P450, GST e GT são induzidos rapidamente após aplicação dos protetores (Zhang *et al.*, 2007; Duhoux *et al.*, 2017b; Sun *et al.*, 2017). Essa indução é semelhante à sinalização que ocorre em plantas através de oxilipinas, que são pequenas moléculas lipofílicas que causam sinalização a estresse biótico e abiótico nas plantas, semelhante à indução por protetores (Mueller e Berger, 2009; Riechers *et al.*, 2010). Recentes estudos apontam que certas moléculas oxilipinas têm potencial de induzir genes relacionados à detoxificação como também conferir proteção contra herbicidas em cereais (Brazier-Hicks *et al.*, 2018). Assim, algumas hipóteses da cascata de reações causada pela aplicação de protetores podem estar envolvidas com a sinalização de oxilipinas nas plantas (Nandula *et al.*, 2019).

Os herbicidas comercialmente disponíveis que contêm protetores em suas formulações podem apresentar efeito sobre as plantas daninhas (Cummins *et al.*, 2009). No entanto, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura que investigam o efeito de protetores em plantas daninhas (Cummins *et al.*, 2009; Elmore *et al.*, 2016; Duhoux *et al.*, 2017b). O aumento da expressão de genes da família GSTs em biótipos suscetíveis da espécie de planta daninha *Alopecurus myosuroides* foi associado ao aumento do metabolismo de herbicidas inibidores da ACCase após o uso do herbicida associado com o protetor mefenpir-dietil (Cummins *et al.*, 2009). Por outro lado, o protetor mefenpir-dietil não teve efeito na evolução do mecanismo de resistência N-RELA em *A. myosuroides* quando associado com os herbicidas mesosulfuron e iodosulfuron (Rosenhauer *et al.*, 2016). O uso de protetores como cloquintocet-mexyl e mefenpir-dietil associados com herbicidas pyroxsulam e iodosulfuron + mesosulfuron foram responsáveis pelo aumento da metabolização dos herbicidas devido ao aumento da expressão de mais de 10 genes de detoxificação em plantas de *Lolium* sp. (Duhoux *et al.*, 2017b). Apesar dessas pesquisas demonstrarem os efeitos dos protetores na diminuição do controle dos herbicidas nas plantas daninhas, todos investigaram o efeito da associação dos herbicidas com protetores apenas em aplicações únicas. O uso de protetor associado com o herbicida pode estar potencializando a evolução da resistência de plantas daninhas pelo mecanismo N-RELA através de aplicações recorrentes, como ocorre quando usado herbicidas em subdoses (Neve e Powles, 2005a; Yu *et al.*, 2013; Tehranchian *et al.*, 2017). Ainda, o possível efeito do

protetor na evolução da resistência N-RELA aos herbicidas inibidores da enzima ACCase não foi investigado em *Echinochloa crus-galli* até o momento.

2.4 Utilização de mistura de herbicidas para evitar a ocorrência de resistência aos herbicidas

Com o aumento do número de espécies de plantas daninhas resistentes aos herbicidas, vários manejos práticos são recomendados para mitigar esse problema (Norsworthy *et al.*, 2012). Entre as principais estratégias de manejo, destacam-se o controle de plantas daninhas nas áreas limites das lavouras, rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, rotação de culturas, utilização de herbicidas pré e pós emergentes, utilização de culturas competitivas, aplicação sequencial e a mistura de herbicidas (Beckie e Harker, 2017). Dentre esses manejos, a aplicação sequencial de herbicidas e também o uso de mistura de herbicidas são práticas antigas, mas ainda muito utilizadas devido ao bom resultado no controle das plantas daninhas e também à redução de custo de aplicação (Zhang *et al.*, 1995; Gazziero, 2015; Matzenbacher *et al.*, 2015b).

A regulamentação do uso de mistura de pesticidas sempre é assunto de muito debate no Brasil. Até os anos 80 existiam informações técnicas produzidas pelas empresas e academias a respeito das misturas em tanques, e eram passadas para engenheiros agrônomos e produtores rurais (GAZZIEIRO, 2015). Em meados de 1985, todas as instruções de uso de mistura em tanques foram retiradas pelo Ministério da Agricultura e da Associação Nacional de Defesa Vegetal (LIMA, 1997). A partir desse período, inúmeras discussões, reuniões, debates em encontros de profissionais em congressos científicos foram realizados para tentar reverter a situação. Com isso, a Portaria n° 67 foi publicada em 1995 (BRASIL, 1995), em que as empresas químicas poderiam incluir nos seus registros a recomendação de misturas em tanques. Novas discussões surgiram tentando identificar as vantagens e desvantagens da mistura em tanques, e em 26 de junho de 2002, através da Instrução Normativa n°46 (BRASIL, 2002), a Portaria n° 67 foi revogada e foi determinado que as empresas titulares de registros de agrotóxicos retirassem as indicações de misturas em tanques dos rótulos e bulas. Através de novas discussões, novos questionamentos foram levantados se era ou não proibido o uso de misturas no Brasil e a mistura de tanques não era regulamentada. Durante esse período, um levantamento foi realizado e publicado no ano de 2015 e mostrou que, mesmo sem a regulamentação, a utilização da mistura de pesticidas em tanque ocorria em praticamente 97% das propriedades agrícolas do Brasil e dentre destes, 95% utilizavam de dois a cinco agrotóxicos por mistura em tanque (GAZZIEIRO, 2015). Nesse período, outros

países como Estados Unidos, Canadá e União Europeia já apresentavam regulamentação sobre o assunto, com indicação e recomendações sobre os resultados das misturas dos produtos nos rótulos (ROTTER *et al.*, 2019). Através da pressão dos profissionais da área, dos resultados do levantamento, pela falta de regulamentação e necessidade de um profissional da área responsável para a recomendação das misturas em tanques, a Instrução Normativa nº 40 foi publicada em 15 de outubro de 2018 autorizando os engenheiros agrônomos a receitar a aplicação combinada de agroquímicos (BRASIL, 2018). A partir desse momento, cabe ao Engenheiro Agrônomo, profissional que tem a competência, a responsabilidade para a prescrição das misturas em tanques no Brasil.

A mistura de herbicidas proporciona um aumento no espectro de controle, reduzindo o custo de produção e prevenindo o desenvolvimento de biótipos resistentes aos herbicidas (Zhang *et al.*, 2005; Abendroth *et al.*, 2011). A prática da mistura de herbicidas tem grande efeito em prevenir principalmente a resistência relacionada ao local de ação dos herbicidas, quando associada à utilização de herbicidas de diferentes mecanismos de ação (Beckie e Reboud, 2009). Nas aplicações isoladas ou em rotações anuais de herbicidas, ocorre pressão de seleção imposta apenas por um mecanismo de ação, enquanto na aplicação da mistura de herbicidas ocorre pressão de seleção múltipla e simultânea, permitindo sobreviver apenas indivíduos raros que já tenham desenvolvido resistência múltipla via mutação nos loci das enzimas alvo (Norsworthy *et al.*, 2012). No entanto, a prevenção da resistência ocorre apenas quando os componentes da mistura de herbicidas são efetivos na espécie alvo e em muitos casos, o controle total das plantas pode não ser atingido (Norsworthy *et al.*, 2012). Essa falha de controle das plantas daninhas na população quando do uso de mistura de herbicidas pode também estar relacionada às interações entre os herbicidas durante o processo da mistura ou mesmo depois de atingir a planta pela aplicação de subdoses dos herbicidas na mistura, que podem apresentar efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos (Zhang *et al.*, 1995; Abendroth *et al.*, 2011).

Alguns modelos de referência são empregados para prever qual tipo de interação ocorrerá em determinada mistura de herbicidas. Os modelos mais empregados para a verificação das interações são as curvas de dose-resposta aos herbicidas, o método de Colby e o modelo usando isobogramas de aditividade (Colby, 1967; Kaushik *et al.*, 2006; Sobyte *et al.*, 2011; Matzenbacher *et al.*, 2015b; Ritz *et al.*, 2015). Nas misturas de herbicidas, o efeito antagônico ocorre em mais de 70% dos casos, mesmo usando herbicidas de mecanismos de ação diferentes (Zhang *et al.*, 1995). Misturas de herbicidas contendo inibidores de ACCase são frequentemente relatados apresentando antagonismo (Matzenbacher *et al.*, 2015b). A mistura de fenoxaprope-p-etílico com penoxsulam,

quinclorac, imazetapir e bispiribac-sódico ou com clomazone + propanil ou tiobencarbe, resulta em efeito antagônico no controle de *E. crus-galli* (Zhang *et al.*, 2005; Blouin *et al.*, 2010; Matzenbacher *et al.*, 2015b). Outros efeitos antagônicos também são encontrados utilizando misturas de inibidores da enzima ALS com inibidores de carotenóides (Matzenbacher *et al.*, 2015b). Por outro lado, efeitos sinérgicos são encontrados quando se associam herbicidas como clomazone e propanil + tiobencarbe, clomazone e metribuzin, cialofop-butil e quinclorac, mesotrione e atrazina, entre outros (Abendroth *et al.*, 2006; Matzenbacher *et al.*, 2015b).

A prática da mistura ocorre, na maioria das vezes, sem acompanhamento, conhecimento prévio por parte do produtor e até mesmo sem recomendação por profissional da sobre as doses e características dos herbicidas utilizados (Matzenbacher *et al.*, 2015b). Em alguns casos, os produtores utilizam a dose máxima do rótulo de ambos os herbicidas associados, ou em outros casos, reduzem as doses de ambos os herbicidas utilizados na mistura (Gazziero, 2015). A prática de redução de dose na mistura não retarda a evolução da resistência aos herbicidas, podendo até mesmo acelerar esta evolução para algum componente da mistura e evoluir para resistência cruzada (Lagator *et al.*, 2013). A utilização de subdoses de herbicidas não apresenta controle desejável de plantas daninhas na população e aumenta o potencial de surgimento da resistência por metabolização (Neve e Powles, 2005a). Do mesmo modo, a mistura de herbicidas pode não atingir o controle total da população de plantas daninhas quando aplicada em subdoses, mesmo usando herbicidas de diferentes mecanismos de ação (Norsworthy *et al.*, 2012).

Plantas daninhas suscetíveis que sobrevivem às aplicações de subdoses de herbicidas apresentam alelos que conferem certa tolerância à pequenas doses (Ghanizadeh e Harrington, 2017b). Essas plantas sobreviventes têm capacidade de se cruzar e produzir sementes, contribuindo assim para aumentar a variabilidade e acumular alelos de genes detoxificantes em suas progênes (Busi *et al.*, 2013; Ashworth *et al.*, 2016). Deste modo, as progênes terão maior capacidade de metabolizar concentrações cada vez mais altas dos herbicidas ao passar das gerações (Delye, 2013). Em caso de aplicação da mistura em subdoses, a pressão de seleção em plantas daninhas ocorre de forma múltipla e simultaneamente, ou seja, as plantas sobreviventes poderão possuir alelos de genes de metabolização com capacidade de detoxificação de ambas as moléculas dos herbicidas. Essas plantas irão cruzar e produzir sementes, favorecendo o acúmulo de alelos de genes detoxificantes de ambos os herbicidas nas suas progênes, tornando-as menos sensíveis aos herbicidas. Ainda, o efeito de um dos produtos componentes da mistura pode contribuir para a evolução de genes associados à tolerância ao outro produto, resultando no favorecimento

da resistência a este composto. No entanto, inexistem estudos sobre o efeito de misturas de herbicidas em relação à evolução da resistência a estes produtos.

2.5 Referências Bibliográficas

- ABENDROTH, J. A. *et al.* Joint action analysis utilizing concentration addition and independent action models. **Weed Technology**, Champaign, v. 25, n. 3, p. 436-446, 2011.
- ABENDROTH, J. A.; MARTIN, A. R.; ROETH, F. W. Plant response to combinations of mesotrione and photosystem II inhibitors. **Weed Technology**, Champaign, v. 20, n. 1, p. 267-274, 2006.
- AHRENS, H. *et al.* 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors in combination with safeners: solutions for modern and sustainable agriculture. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 52, n. 36, p. 9388-9398, 2013.
- ASHWORTH, M. B. *et al.* Recurrent selection with reduced 2,4-D amine doses results in the rapid evolution of 2,4-D herbicide resistance in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 11, p. 2091-2098, 2016.
- BECKIE, H. J.; HARKER, K. N. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 6, p. 1045-1052, 2017.
- BECKIE, H. J.; REBOUD, X. Selecting for weed resistance: herbicide rotation and mixture. **Weed Technology**, Champaign, v. 23, n. 3, p. 363-370, 2009.
- BECKIE, H. J.; TARDIF, F. J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, Guildford, v. 35, p. 15-28, 2012.
- BI, Y. L. *et al.* Molecular basis of multiple resistance to ACCase- and ALS-inhibiting herbicides in *Alopecurus japonicus* from China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 126, p. 22-27, 2016.
- BLOUIN, D. C.; WEBSTER, E. P.; BOND, J. A. On a method of analysis for synergistic and antagonistic joint-action effects with fenoxaprop mixtures in rice (*Oryza sativa*). **Weed Technology**, Champaign, v. 24, n. 4, p. 583-589, 2010.
- BRAZIER-HICKS, M. *et al.* Testing a chemical series inspired by plant stress oxylipin signalling agents for herbicide safening activity. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 74, n. 4, p. 828-836, 2018.
- BRASIL. Instrução Normativa nº40 de outubro de 2018. Estabelece regras complementares a emissão da receita agrônômica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de outubro de 2018. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/07172824-instrucao-normativa-n-40-de-11-de-outubro-de-2018-regras-complementares-a-receita-agronomica-1.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2019.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 46 de julho de 2002. Determina às empresas titulares de registros de agrotóxicos a retirada das indicações de misturas em tanque dos rótulos e bulas

de seus agrotóxicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jul. 2002. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=1&pagina=53&data=26/07/2002&captchafield=firstAccess>. Acesso em: 01 jun. 2019.

BRASIL. Portaria nº 67 de 30 de maio de 1995. Regulamenta o uso das misturas de agrotóxicos em tanque. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 mai. 1995. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mapa_sda/1995/prt0067_30_05_1995.html. Acesso em: 01 jun. 2019.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2014: Impacts on pesticide use and carbon emissions. **Gm Crops & Food**, Philadelphia, v. 7, n. 2, p. 84-116, 2016.

BURGOS, N. R. *et al.* Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, Champaign, v. 61, n. 1, p. 4-20, 2013.

BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 6, n. 2, p. 231-242, 2013.

CEDERGREEN, N. *et al.* A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 27, n. 7, p. 1621-1632, 2008.

CHEN, G. Q. *et al.* Fenoxaprop-P-ethyl resistance conferred by cytochrome P450s and target site mutation in *Alopecurus japonicus*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 74, n. 7, p. 1694-1703, 2018.

CLARK, R. D. A perspective on the role of quantitative structure-activity and structure-property relationships in herbicide discovery. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 4, p. 513-518, 2012.

COLBY, S. R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. **Weeds**, Ithaca, v. 15, n. 1, p. 20-37, 1967.

CUMMINS, I.; BRYANT, D. N.; EDWARDS, R. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 807-820, 2009.

CUMMINS, I. *et al.* Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 110, n. 15, p. 5812-5817, 2013.

DALAZEN, G. *et al.* Degradation enhancement as the mechanism of resistance to imazethapyr in barnyardgrass. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 36, p. 13, 2018a.

DALAZEN, G. MARKUS, C. MEROTTO JR, A. Differential expression of genes associated with degradation enhancement of imazethapyr in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 10, n. 9, p. 389-401, 2018b.

DAVIES, L. R.; NEVE, P. Interpopulation variability and adaptive potential for reduced glyphosate sensitivity in *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 323-332, 2017.

DELYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forth coming decade. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2013.

DUHOUX, A.; CARRERE, S.; DELYE, C. Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium* sp.) plants with non-target -site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. **Plant Science**, Shannon, v. 257, p. 22-36, 2017a.

DUHOUX, A. *et al.* Herbicide safeners decrease sensitivity to herbicides inhibiting acetolactate-synthase and likely activate non-target-site-based resistance pathways in the major grass weed *Lolium* sp (rye-grass). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, [art.] 1310, p. 14, 2017b.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. **Discovery and Synthesis of Crop Protection Products**, Washington, DC, v. 1204, p. 79-92, 2015.

DYER, W. E. Stress-induced evolution of herbicide resistance and related pleiotropic effects. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 74, n. 8, p. 1759-1768, 2018.

ELMORE, M. T. *et al.* Herbicide safeners increase creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) tolerance to pinoxaden and affect weed control. **Weed Technology**, Champaign, v. 30, n. 4, p. 919-928, 2016.

FIGUEIREDO, M. R. A. *et al.* Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 74, n. 10, p. 2356-2362, 2018.

GAINES, T. A. *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **Plant Journal**, Oxford, v. 78, n. 5, p. 865-876, 2014.

GAINES, T. A. *et al.* Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **PNAS**, Washington, DC, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GARCIA, M. D. *et al.* Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. **PNAS**, Washington, DC, v. 114, n. 7, p. 1091-1100, 2017.

GAZZIERO, D. L. P. Mixtures of pesticides in tank, in brazilian farms. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 83-92, 2015.

GERHARDS, R. *et al.* An approach to investigate the costs of herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 407-414, 2016.

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 36, n. 1, p. 24-34, 2017a.

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C. Perspectives on non-target site mechanisms of herbicide resistance in weedy plant species using evolutionary physiology. **Aob Plants**, Oxford, v. 9, p. 5, 2017b.

GOULD, F.; BROWN, Z. S.; KUZMA, J. Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? **Science**, Washington, DC, v. 360, n. 6390, p. 728-732, 2018.

GRESSEL, J. Global advances in weed management. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 149, p. 47-53, 2011.

GUO, L. B. *et al.* *Echinochloa crus-galli* genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed. **Nature Communications**, London, v. 8, p. 10, 2017.

HAN, H. P. *et al.* Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 69, n. 9, p. 996-1000, 2013.

HARRE, N. T.; YOUNG, J. M.; YOUNG, B. G. Glyphosate-induced antagonism in rapid response giant ragweed (*Ambrosia trifida*). **Weed Technology**, Champaign, v. 32, n. 1, p. 52-59, 2018.

HATZIOS, K. K. Herbicide antidotes - development, chemistry, and mode of action. **Advances in Agronomy**, Amsterdam, v. 36, p. 265-316, 1983.

HATZIOS, K. K.; BURGOS, N. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 454-467, 2004.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. [2019]. Disponível em <<http://www.weedscience.com>> Acesso em: 10 de março de 2019.

HICKS, H. L. *et al.* The factors driving evolved herbicide resistance at a national scale. **Nature Ecology & Evolution**, London, v. 2, n. 3, p. 529-536, 2018.

INOUE, M. H. *et al.* Clomazone selectivity in cotton seeds treated with dietholate and zinc acetate. **Semina-Ciencias Agrarias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 2905-2917, 2015.

IWAKAMI, S. *et al.* CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. **New Phytologist**, London, v. 221, n. 4, p. 2112-2122, 2019.

IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014a.

IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 genes induced by bispyribac- sodium treatment in a multiple- herbicide- resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 4, p. 549-558, 2014b.

JESCHKE, P. Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 3, p. 433-455, 2016.

- KAUSHIK, S. *et al.* Activities of mixtures of soil-applied herbicides with different molecular targets. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, n. 11, p. 1092-1097, 2006.
- KOO, D. H. *et al.* Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. **PNAS**, Washington, DC, v. 115, n. 13, p. 3332-3337, 2018.
- KRAEHMER, H. *et al.* Herbicides as weed control agents: state of the art: I. weed control research and safener technology: the path to modern agriculture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1119-1131, 2014.
- KREINER, J. M.; STINCHCOMBE, J. R.; WRIGHT, S. I. Population genomics of herbicide resistance: adaptation via evolutionary rescue. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 69, n. 29, p.611-635. 2018.
- LAFOREST, M. *et al.* Acetyl-CoA carboxylase overexpression in herbicide-resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 11, p. 2227-2235, 2017.
- LAGATOR, M. *et al.* Herbicide mixtures at high doses slow the evolution of resistance in experimentally evolving populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. **New Phytologist**, London, v. 198, n. 3, p. 938-945, 2013.
- LIMA, L. C. F. **Produtos fitossanitários: misturas em tanque**. Cascavel: Ocepar/Coodetec/Associação Nacional de Defesa Vegetal, 1997. 13 p. (Relatório Técnico).
- LINDELL, S. *et al.* HPPD Herbicide-Safener combinations as resistance breaking solutions for 21st century agriculture. **Discovery and Synthesis of Crop Protection Products**, Washington, DC, v. 1204, p. 219-231, 2015.
- MAROLI, A. S. *et al.* Omics in Weed Science: A perspective from genomics, transcriptomics, and metabolomics approaches. **Weed Science**, Champaign, v. 66, n. 6, p. 681-695, 2018.
- MATZENBACHER, F. O. *et al.* Antagonism is the predominant effect of herbicide mixtures used for imidazolinone-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 587-597, 2015b.
- MATZENBACHER, F. O. *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015a.
- MCCOURT, J. A. *et al.* Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **PNAS**, Washington, DC, v. 103, n. 3, p. 569-573, 2006.
- MUELLER, M. J.; BERGER, S. Reactive electrophilic oxylipins: Pattern recognition and signalling. **Phytochemistry**, London, v. 70, n. 13-14, p. 1511-1521, 2009.

- NAKKA, S. *et al.* Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 11, p. 2236-2243, 2017.
- NANDULA, V. K. *et al.* Herbicide metabolism: crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. **Weed Science**, Champaign, v. 67, n. 2, p. 149-175, 2019.
- NEVE, P.; POWLES, S. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. **Heredity**, London, v. 95, n. 6, p. 485-492, Dec 2005a.
- NEVE, P.; POWLES, S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n. 6, p. 1154-1166, Apr 2005b.
- NORSWORTHY, J. K. *et al.* Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, Champaign, v. 60, p. 31-62, 2012.
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 144, p. 31-43, 2006.
- OWEN, M. D. K.; ZELAYA, I. A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 61, n. 3, p. 301-311, 2005.
- PETIT, C. *et al.* Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate-synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds. **Plant Science**, Shannon, v. 178, n. 6, p. 501-509, 2010.
- POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.317-347, 2010.
- PRESTON, C. *et al.* Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 54, n. 2, p. 123-134, 1996.
- PRESTON, C. Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: complications for management. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 448-453, 2004.
- QU, R. Y. *et al.* Computational design of novel inhibitors to overcome weed resistance associated with acetohydroxyacid synthase (AHAS) P197L mutant. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 7, p. 1373-1381, 2017.
- RIECHERS, D. E.; KREUZ, K.; ZHANG, Q. Detoxification without Intoxication: Herbicide safeners activate plant defense gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 1, p. 3-13, 2010.
- RITZ, C. *et al.* Dose-response analysis using R. **Plos One**, São Francisco, v. 10, n. 12, p. 13, 2015.
- ROSENHAUER, M., ROSINGER, C., PETERSEN, J. Impact of the safener mefenpyr-diethyl on herbicide resistance evolution in *Alopecurus myosuroides* (Huds.) biotypes. **Julius-Kühn-Arch**, Quedlinburg, v. 452, p. 50-56. 2016.

ROSINGER, C. Herbicide safeners: an overview. **Julius-Kühn-Arch**, Quedlinburg, v. 443, p. 516–525. 2014.

ROSINGER, C., BARTSCH, K., SCHULTE, W. Safeners for herbicides. *In*: KRÄMER, W. *et al.* (ed) **Modern Crop Protection Compounds**. 2nd, ed. Weinheim, Germany: 2012. pp. 371-397.

ROSINGER, C; SCHULTE, W. **Safeners for herbicides**. *In*: JESCHKE, P. *et al.* (ed) **Modern Crop Protection Compounds**. 3rd, ed. Weinheim, Germany, 2019. p 425-450.

ROTTER, S. *et al.* Overview on legislation and scientific approaches for risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: the potential EuroMix contribution. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 48, n. 9, p. 796-814. 2019.

RUEGG, W. T.; QUADRANTI, M.; ZOSCHKE, A. Herbicide research and development: challenges and opportunities. **Weed Research**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 271-275, 2007.

SAIKA, H. *et al.* A novel rice cytochrome P450 gene, CYP72A31, confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1232-1239, 2014.

SANCHOTENE, D. M. *et al.* Phorate and dietholate act as safeners for rice against clomazone at high doses. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 909-912, 2010.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochemistry Reviews**, Heidelberg, v. 5, p. 445–458, 2006.

SOBYE, K. W.; STREIBIG, J. C.; CEDERGREEN, N. Prediction of joint herbicide action by biomass and chlorophyll a fluorescence. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 23-32, 2011.

SONG, J. S. *et al.* Cross-resistance of Echinochloa species to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Weed Biology and Management**, Carlton, v. 17, n. 2, p. 91-102, 2017.

SUN, L. L. *et al.* Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. **Plos One**, São Francisco, v. 12, n. 3, p. 1-16, 2017.

SWITZER, C. M. The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot. *In*: ANNUAL MEETING OF THE NORTHEASTERN WEED CONTROL CONFERENCE, 11., 1957, New York. **Proceedings of the ...**New York: Northeastern Weed Science Society, 1957. p. 315–318.

TEHRANCHIAN, P. *et al.* Recurrent sublethal-dose selection for reduced susceptibility of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to dicamba. **Weed Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 206-212, 2017.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Champaign, v. 50, n. 6, p. 700-712, 2002.

VAN GAELLEN, H. *et al.* Simulation of crop production in weed-infested fields for data-scarce regions. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 154, n. 6, p. 1026-1039, 2016.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000.

WRIGHT, A. A. *et al.* Multiple herbicide-resistant junglerice (*Echinochloa colona*): identification of genes potentially involved in resistance through differential gene expression analysis. **Weed Science**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 347-354, 2018.

WSSA - WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Herbicide resistance and herbicide tolerance defined. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, n. 4, p. 789-790. 1994.

YU, Q. *et al.* Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. **Planta**, Heidelberg, v. 230, n. 4, p. 713-723, Sep 2009.

YU, Q. *et al.* Enhanced rates of herbicide metabolism in low herbicide-dose selected resistant *Lolium rigidum*. **Plant Cell and Environment**, London, v. 36, n. 4, p. 818-827, 2013.

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1106-1118, 2014.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART, C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

ZHANG, J. H.; HAMILL, A. S.; WEAVER, S. E. Antagonism and synergism between herbicides - trends from previous studies. **Weed Technology**, Champaign, v. 9, n. 1, p. 86-90, 1995.

ZHANG, Q. *et al.* Safeners coordinately induce the expression of multiple proteins and MRP transcripts involved in herbicide metabolism and detoxification in *Triticum tauschii* seedling tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 8, p. 1261-1278, 2007.

ZHANG, W. *et al.* Fenoxaprop interactions for barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control in rice. **Weed Technology**, Champaign, v. 19, n. 2, p. 293-297, 2005.

ZHANG, X. Q.; POWLES, S. B. Six amino acid substitutions in the carboxyl-transferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* population. **New Phytologist**, London, v. 172, n. 4, p. 636-645, 2006.

ZHAO, N. *et al.* Transcriptome profiling to identify genes involved in mesosulfuron-methyl resistance in *Alopecurus aequalis*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 1-16, 2017.

ZHOU, Q. *et al.* Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 89, n. 2, p. 89-96, 2007.

3 CAPÍTULO 1

**Efeito do protetor isoxadifen na evolução da resistência aos herbicidas em
*Echinochloa crus-galli***

EFEITO DO PROTETOR ISOXADIFEN NA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS EM *Echinochloa crus-galli*

RESUMO

Protetores são compostos químicos utilizados para aumentar a seletividade das culturas através da ativação de genes de detoxificação. Os mecanismos ativados por estes compostos são similares aos relacionados à resistência de plantas daninhas causada por incremento de metabolização. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do protetor isoxadifen-etílico associado ao herbicida fenoxaprope-p-etílico na evolução da resistência aos herbicidas em *Echinochloa crus-galli*. Os biótipos utilizados foram MOST (suscetível aos herbicidas fenoxaprope e imazetapir) e CAMAQ (resistente por metabolização ao imazetapir). O material vegetal constou da seleção de plantas sobreviventes por duas gerações às subdoses de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen. Experimentos de curvas de dose-resposta foram realizados com os herbicidas utilizados nas seleções com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas para avaliar o aumento da tolerância. O potencial para evolução da resistência cruzada e múltipla a outros herbicidas foi avaliada em plantas das gerações G0 e G2 selecionadas. A sobrevivência das plantas de ambos os biótipos de capim-arroz aumentou nas gerações G1 e G2 selecionadas em relação à G0, após aplicações de subdoses de fenoxaprope e, principalmente, após aplicação de fenoxaprope + isoxadifen. O fator de resistência (FR) da geração G2 selecionada com fenoxaprope em relação à G0 foi de 2,3 e 2,2 e o FR da geração G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen foi de 3,3 e 1,8 para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. As plantas da geração G2 selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen apresentaram maiores sobrevivências em relação às plantas da G0 após aplicação dos herbicidas diclofope, quincloraque e glifosato para o biótipo MOST e para clodinafope, cialofope e quincloraque para o biótipo CAMAQ. A evolução para a resistência aos herbicidas quincloraque nos biótipos MOST e CAMAQ e cialofope no biótipo CAMAQ foram comprovadas com estudo de curva de dose-resposta. A maior tolerância das gerações G2, selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen, foi revertida pela aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas P450. O uso de subdoses do herbicida fenoxaprope associado ou não ao protetor isoxadifen apresenta potencial para a evolução da resistência a este herbicida. O protetor isoxadifen proporcionou maior sobrevivência em relação às subdoses do herbicida fenoxaprope e também maior tolerância a esse herbicida pelas plantas da geração G2 selecionadas. Este é o primeiro relato de envolvimento de protetor na evolução da resistência aos herbicidas. O mecanismo de resistência envolvido na maior tolerância provavelmente é devido à metabolização por enzimas P450.

3.1 Introdução

O baixo desenvolvimento de novas moléculas herbicidas tem direcionado a utilização de protetores ou *safeners* na formulação com herbicidas antigos (Rosinger e Shulte, 2019). Por definição, protetores são compostos químicos utilizados para aumentar a seletividade das culturas sem alterar o efeito principal do herbicida sobre o controle de plantas daninhas (Rosinger, 2014). Esses produtos são compostos orgânicos bioativos que são aplicados em associação com herbicidas ou como tratamentos de sementes (Hatzios e Burgos, 2004). Os protetores são usados, na sua maioria, associados com herbicidas inibidores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase), acetolactato sintetase (ALS) e também com inibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) (Ahrens *et al.*, 2013). Muitos herbicidas disponíveis comercialmente possuem protetores nas suas formulações (Jeschke, 2016). Herbicidas inibidores da enzima ALS e ACCase possuem grande utilização e, devido a isto, tem sido identificado grande número de biótipos resistentes em praticamente todo o mundo (Heap, 2019). Esse aumento de utilização em diversos casos é proporcionado pelo uso de protetores. Um dos protetores mais utilizado é o isoxadifen-etílico que é associado, por exemplo, aos herbicidas foramsulfuron e tembotriona para a cultura do milho e em fenoxaprope-p-etílico para a cultura do arroz (Ahrens *et al.*, 2013; Rosinger e Shulte, 2019). Grande parte do conhecimento sobre mecanismo de ação de protetores ocorre em estudos em culturas e existem poucos estudos em relação ao efeito em plantas daninhas e, principalmente, sobre a contribuição desses produtos na evolução da resistência aos herbicidas.

A maior seletividade nas culturas através do uso de protetor ocorre devido a esses aumentarem a velocidade de degradação do herbicida pela ativação de genes de detoxificação (Hatzios e Burgos, 2004). A ação das moléculas do protetor ocorre rapidamente quando atinge a planta, antes que a molécula herbicida cause fitotoxicidade à cultura (Rosinger e Shulte, 2019). O uso de protetor aumenta o conteúdo de proteínas e enzimas envolvidas em fases sucessivas de metabolismo de xenobiótico pelo aumento da transcrição de genes relacionados à metabolização (Zhang *et al.*, 2007). Este aumento da degradação do herbicida desencadeado pelo protetor é similar ao mecanismo de resistência aos herbicidas não relacionada ao local de ação, encontrado em várias plantas daninhas (Yuan *et al.*, 2007; Ghanizadeh e Harrington, 2017). As famílias de enzimas nas quais os protetores agem foram identificadas e são as mesmas relacionadas à resistência das plantas daninhas por metabolização, como enzimas do citocromo P450 (CYP), glicosil-transferases

(GT), glutationa-S-transferases (GST) e até mesmo proteínas transportadores ABC (Hatzios e Burgos, 2004; Powles e Yu, 2010; Delye, 2013).

O uso de protetores vem aumentando consideravelmente, no entanto, poucos são os trabalhos que estudam o efeito destes compostos em plantas daninhas. Em *Alopercurus myosuroides* foi verificado que os protetores mefenpir-dietil e fenclorazole-etílico aumentaram a degradação do herbicida fenoxaprope-p-etílico pela conjugação com glutationa (Cummins *et al.*, 2009). O efeito dos protetores é variável entre as espécies de plantas daninhas, mas não existem indicações precisas sobre as causas desta variação. O controle de *Agrostis stolonifera* foi reduzido pelo uso do herbicida topramezone quando associado com os protetores cloquintocet, isoxadifen e mefenpir (Elmore *et al.*, 2015). Os mesmos protetores cloquintocet e mefenpir foram identificados como sendo responsáveis pelo menor controle de *Lolium* sp. pelos herbicidas piroxsulam e iodosulfuron + mesosulfuron (Duhoux *et al.*, 2017b). No entanto, outros estudos demonstram que não houve diminuição do controle de *A. myosuroides* em relação à aplicação do herbicida iodosulfuron e mesosulfuron associado com mefenpir em várias concentrações (Rosenhauer *et al.*, 2016).

Este estudo avalia o efeito de protetores em relação ao aumento da capacidade de metabolização de herbicidas ao longo de gerações de seleção. Estudos similares avaliaram o efeito do uso recorrente de subdoses de herbicidas na evolução da resistência de plantas daninhas devido aos fatores relacionados à metabolização das plantas (Neve e Powles, 2005b). Esta evolução da resistência é significativamente mais rápida em espécies de plantas daninhas que apresentam fecundação cruzada obrigatória como *Lolium* sp. em comparação com uma espécie autógama como *Avena fatua*, em que o uso de subdoses de diclofope proporcionou o aumento do fator de resistência em 40 e 2 vezes, respectivamente, em apenas três gerações (Busi *et al.*, 2013; Busi *et al.*, 2016). Isto demonstra que em espécies autógamas, apesar de evoluírem para resistência após o uso de subdoses, a evolução para aumento da tolerância ocorre de forma mais lenta devido à baixa diversidade genética dentro da população e à característica comumente monogênica da resistência em espécies autógamas (Kreiner *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante a ser considerado a partir do uso de subdoses é a evolução da resistência múltipla, ou seja, resistência a herbicidas de outros mecanismos de ação. O uso de subdoses de 2,4-D amina na seleção de *Raphanus raphanistrum* evoluiu rapidamente resistência a este herbicida, mas também resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS (Ashworth *et al.*, 2016). O uso de subdoses de diclofope na seleção de plantas de *A. fatua* proporcionou rápida evolução da resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS (Busi *et al.*, 2016). A resistência por metabolização em plantas daninhas apresenta esta

característica da capacidade de metabolizar herbicidas de diferentes grupos e até mesmo moléculas que nunca antes foram aplicadas (Nandula *et al.*, 2019).

A evolução da resistência a partir da seleção por subdoses ocorre devido ao acúmulo de alelos de menor efeito de genes relacionados à metabolização dos herbicidas, principalmente genes da família CYP e GSTs (Neve e Powles, 2005a; Yu e Powles, 2014). Vários genes da família *CYP81*, *CYP72* e *GST* já foram identificados como sendo responsáveis pela resistência aos herbicidas em várias espécies de plantas daninhas (Iwakami *et al.*, 2014a; Duhoux *et al.*, 2017a; Chen *et al.*, 2018; Varanasi *et al.*, 2018). Os genes destas mesmas famílias também foram identificadas como responsáveis pela diminuição do controle das espécies *A. myosuroides*, *Lolium* sp. e *Agrostis stolonifera* aos herbicidas fenoxaprope-p-etílico, iodosulfuron + mesosulfuron e pinoxaden, respectivamente, devido ao uso de protetores (Cummins *et al.*, 2009; Duhoux *et al.*, 2017b). As enzimas detoxificantes codificadas por estes genes apresentam característica de pouca especificidade, ou seja, podem metabolizar moléculas de herbicidas de vários grupos químicos diferentes (Ghanizadeh e Harrington, 2017). Devido a estas características, a evolução da resistência aos herbicidas por metabolização é a mais preocupante, pela perda crescente da possibilidade de uso de herbicidas de diferentes mecanismos de ação.

O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) é uma das plantas daninhas mais importantes mundialmente, infestando principalmente lavouras de arroz (Kraehmer *et al.*, 2016). Esta espécie é controlada por herbicidas que contêm protetores em sua formulação e apresenta grandes problemas de resistência aos herbicidas (Heap, 2019). A resistência aos herbicidas inibidores da enzima ACCase e inibidores da enzima ALS é mais problemática pela importância desses produtos, e o mecanismo de resistência encontrado em diversos estudos está relacionado ao incremento de metabolização (Matzenbacher *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2017; Dalazen *et al.*, 2018a). A maior atividade de enzimas P450 e aumento da conjugação por glutatona foram mecanismos sugeridos no envolvimento da resistência de biótipos de capim-arroz ao herbicida fenoxaprope-p-etílico (Yun *et al.*, 2005; Bakkali *et al.*, 2007). O herbicida fenoxaprope-p-etílico é utilizado para o controle de *E. crus-galli* em lavouras de arroz no Brasil e é formulado com o protetor isoxadifen para proporcionar seletividade à cultura. A hipótese deste estudo é que o efeito de protetores pode contribuir para a evolução da resistência em plantas daninhas, principalmente causada por metabolização de forma similar ao que ocorre quando usados herbicidas em subdoses.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do uso recorrente de subdoses do herbicida fenoxaprope-p-etílico em associação com o protetor isoxadifen-etílico na evolução da resistência a herbicidas em *Echinochloa crus-galli*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Para a realização dos experimentos foram utilizados dois biótipos de *E. crus-galli* (capim-arroz), identificados como MOST e CAMAQ coletados em lavouras de arroz no estado do Rio Grande do Sul na safra de 2011/12 (Matzenbacher *et al.*, 2015). Em trabalhos preliminares, o biótipo MOST foi caracterizado como suscetível aos herbicidas inibidores da enzima ALS, ACCase e quincloraque (dados não apresentados). O biótipo CAMAQ, estudado em trabalhos anteriores, foi caracterizado como resistente ao herbicida imazetapir, com fator de resistência (FR) de 8,1 e suscetível ao herbicida quincloraque (FR de 2,3) (Matzenbacher *et al.*, 2015). Nesse trabalho, as curvas de dose-resposta foram realizadas em soluções hidropônicas e o uso dos inibidores de metabolização como malathion e PBO não reverteram a resistência ao imazetapir (Matzenbacher *et al.*, 2015). Deste modo, para início deste estudo, trabalhos preliminares foram realizados para caracterizar a resistência desse biótipo através de curva de dose-resposta com o herbicida imazetapir e sequenciamento do gene ALS. No estudo de curva de dose-resposta, as plantas de capim-arroz foram mantidas em copos preenchidos com solo e a aplicação dos inibidores foi realizada duas horas antes da aspersão das doses do imazetapir. Os inibidores foram capazes de diminuir a dose para controlar 50% das plantas de >640 g para 255,1 e 218,4 g ha⁻¹ de imazetapir, respectivamente, para malathion e PBO (dados não apresentados). Nenhuma mutação foi encontrada nas posições do gene que conferem resistência aos herbicidas inibidores da ALS (dados não apresentados). A resistência do biótipo CAMAQ ao herbicida imazetapir foi caracterizado em ser pelo incremento de metabolização por enzimas P450.

As sementes dos biótipos foram submetidas à quebra de dormência através da utilização de ácido sulfúrico (P.A.) durante cinco minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente por aproximadamente dois minutos e mantidas em temperatura ambiente para secagem durante duas horas. Posteriormente, as sementes foram distribuídas em bandejas preenchidas com solo para emergência e mantidas em ambiente de casa de vegetação climatizada em temperatura de 25°C ± 3. As bandejas apresentavam dimensões de 35cm (C) x 29 cm (L) x 7,5cm (A), e o solo foi composto por 20 % de substrato de casca de arroz + 80% de solo do tipo argissolo, adubado com 200 kg ha⁻¹ da formulação 10-20-20. A irrigação ocorreu diariamente mantendo lâmina de água até o nível do solo. Para os experimentos de curvas de dose-resposta, as plântulas foram transplantadas para vasos individuais de 200 mL preenchidos com solo, sendo considerado como uma unidade

experimental. Para os experimentos de sobrevivência, as plântulas foram transplantadas para bandejas preenchidas com solo, mantendo uma população de 50 a 80 plantas por bandeja com manutenção de lâmina de água ao nível do solo.

Os herbicidas utilizados foram o fenoxaprope-p-etílico (Podium® EW, 69 g L⁻¹) (fenoxaprope) e fenoxaprope-p-etílico + isoxadifen (Starice®, 69g L⁻¹ fenoxaprope-p-etílico e 75 g L⁻¹ de isoxadifen) (fenoxaprope + isoxadifen). O herbicida Starice® apresenta formulação do ingrediente ativo fenoxaprope juntamente com o protetor isoxadifen. A aplicação dos herbicidas foi realizada em câmara de pulverização automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), utilizando ponta de pulverização TJ8002E. O volume de calda foi de 200 L ha⁻¹, usando pressão de 42 lb pol⁻² e velocidade de deslocamento de 1,16 m s⁻¹. A aspersão dos herbicidas ocorreu no estágio de três a quatro folhas das plantas de capim-arroz. Após as aplicações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada e uma lâmina de água foi mantida ao nível do solo até as avaliações finais dos experimentos.

As variáveis avaliadas nos experimentos de curvas de dose-resposta foram controle visual, massa fresca e seca da parte aérea. O controle visual (%) foi realizado aos 21 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas por meio de escala percentual determinada através de avaliação visual, em que zero significa ausência de sintomas e 100% significa morte da planta. A massa fresca da parte aérea foi avaliada aos 21 DAA através do corte das plantas rente ao solo e mensuração em balança de precisão. Esse material foi seco em estufa com circulação de ar forçada em temperatura de 60°C até peso constante para a determinação da massa seca. Os dados obtidos foram transformados em porcentagem em relação ao tratamento controle sem aplicação.

A variável avaliada para os experimentos de sobrevivência foi a de plantas sobreviventes, realizada a partir da contagem de plantas tratadas e de plantas que apresentassem a emissão de pelo menos uma folha nova aos 21 DAA, consideradas como plantas sobreviventes.

3.2.2 Definição das subdoses

O primeiro estudo realizado foi a definição das subdoses dos herbicidas fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen através de experimento de curva de dose-resposta para cada biótipo. O trabalho foi realizado em casa de vegetação, utilizando esquema fatorial 2 × 9 em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O fator A foi composto pelos

herbicidas fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen e o fator B pelas doses 1,7; 3,4; 6,9; 13,8; 27,6; 55,2; 110,4 e 220,8 g ha⁻¹ do ingrediente ativo.

3.2.3 Seleção das gerações e análise da sobrevivência de G0, G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ

Este estudo foi conduzido através de aplicações recorrentes de subdoses dos herbicidas obtidas a partir do estudo descrito anteriormente no item 3.2.2. As sementes das populações iniciais de capim-arroz do biótipo MOST (MOST-G0) e CAMAQ (CAMAQ-G0) foram utilizadas para análise da sobrevivência na geração G0 e para obtenção de sementes da geração G1. Em cada ciclo de aplicação para seleção foram utilizadas três subdoses de cada herbicida. As doses aplicadas na geração G0 do biótipo MOST foram 13,8; 17,25 e 20,7 g ha⁻¹ para ambos os herbicidas fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen. As plantas sobreviventes na dose 13,8 g ha⁻¹ de fenoxaprop e 17,25 g ha⁻¹ de fenoxaprop + isoxadifen foram selecionadas para produção de sementes da geração G1 do biótipo MOST. As doses aplicadas nas plantas da geração G0 do biótipo CAMAQ foram de 6,9; 13,8 e 20,7 g ha⁻¹ para ambos herbicidas fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen e plantas sobreviventes na dose 13,8 g ha⁻¹ para ambos os herbicidas foram selecionadas para produção de sementes da geração G1 de CAMAQ.

Plantas da geração G1 foram submetidas à nova aplicação de três subdoses dos herbicidas para avaliação de sobrevivência e para obtenção da geração G2. A dose em que as plantas da geração G1 foram selecionadas e, duas doses maiores, foram escolhidas para esta nova aplicação. As doses aplicadas para o biótipo MOST foram de 13,8; 17,25 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprop nas plantas G1 selecionadas com fenoxaprop e de 17,25; 20,7 e 24,15 g ha⁻¹ de fenoxaprop + isoxadifen nas plantas G1 selecionadas com fenoxaprop + isoxadifen. As doses aplicadas para o biótipo CAMAQ foram de 13,8; 20,7 e 27,6 g ha⁻¹ de fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen nas plantas da G1 selecionadas com fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen. As plantas do biótipo MOST sobreviventes das doses 17,25 g ha⁻¹ de fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen e do biótipo CAMAQ sobreviventes das doses 13,8 g ha⁻¹ de fenoxaprop e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprop + isoxadifen foram selecionadas para obtenção de sementes da geração G2. As plantas da geração G2 foram submetidas a nova aplicação de três subdoses dos herbicidas para avaliação de sobrevivência desta geração. Para o biótipo MOST foram aplicadas as doses de 13,8; 17,25 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen e para o biótipo CAMAQ as doses utilizadas foram 13,8; 20,7 e 27,6 g ha⁻¹ de fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen. Em cada ciclo de

seleção, uma população de 40 a 50 plantas de cada biótipo foi utilizada como controle sem seleção de plantas (sem aplicação). Destas plantas, 20 foram escolhidas aleatoriamente para obter as gerações G1 e G2 controle (sem seleção).

A aplicação de cada subdose dos herbicidas foi realizada em uma população média de 186 plantas, distribuídas em três bandejas. As plantas selecionadas em cada geração foram transplantadas para vasos preenchidos com solo com capacidade de 500 mL e mantidas em casa de vegetação para a produção de sementes. Antes do florescimento, as plantas foram isoladas com auxílio de estruturas de tecido, para evitar o fluxo gênico entre as plantas dos diferentes biótipos. No estágio de maturidade, todas as sementes foram coletadas, secadas em estufa de circulação de ar forçado a 40°C por sete dias e, posteriormente, armazenadas em temperatura de 20°C. Esquema representativo dos ciclos de seleção está disposto na Figura 1.

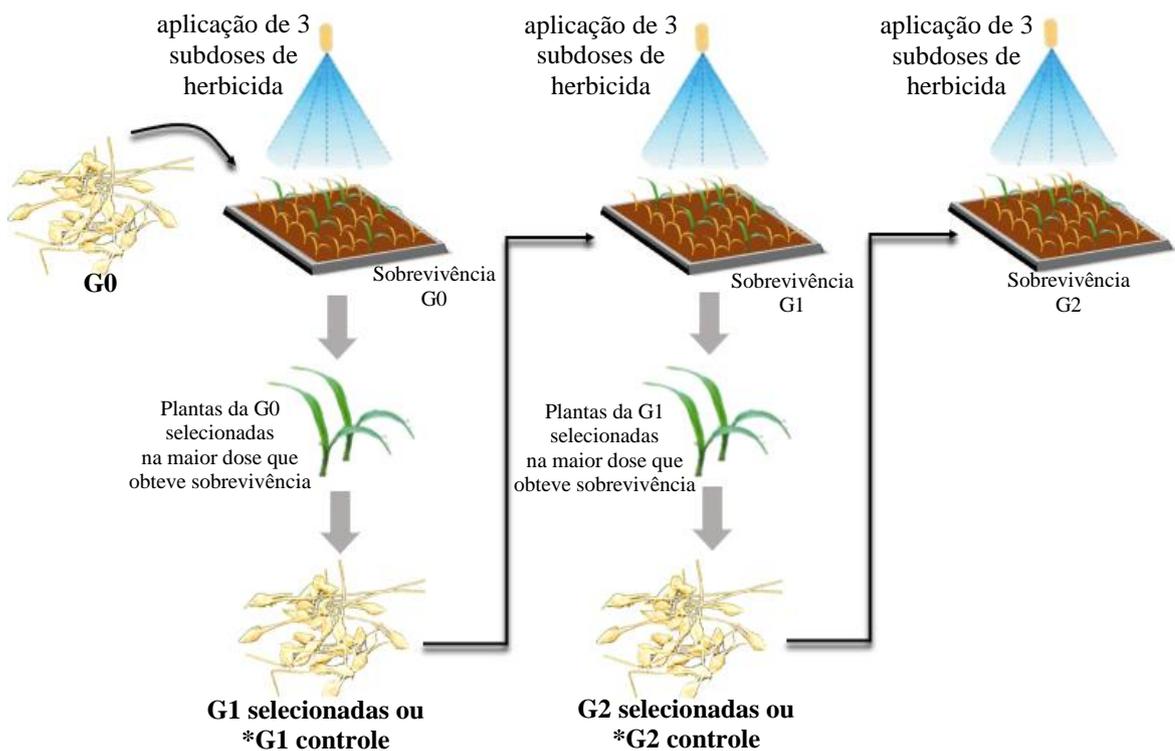


FIGURA 1. Esquema representativo dos ciclos de aplicações de subdoses de cada herbicida, avaliações de sobrevivência e seleção de plantas sobreviventes para composição das gerações G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ. *Para obtenção das gerações controles (G1 e G2 controle) não foi realizada a aplicação de herbicidas.

3.2.4 Curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada

Plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ das gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas com os herbicidas fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen foram submetidas à curva de dose-resposta com cada herbicida utilizado nas seleções das gerações. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3×8 , com 4 repetições. O fator A foi composto pelas gerações de seleção G0, G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada com fenoxaprope ou com fenoxaprope + isoxadifen de cada biótipo (MOST ou CAMAQ). O fator B foi composto pelas doses 0; 1,7; 3,4; 6,9; 13,8; 27,6; 55,2; 110,4 e 220,8g de fenoxaprope ou fenoxaprope + isoxadifen. As variáveis avaliadas foram o controle visual aos 21 DAA; massa fresca e seca da parte aérea.

3.2.5 Caracterização da evolução para resistência cruzada e múltipla

A caracterização da evolução da resistência cruzada e múltipla foi realizada para os herbicidas inibidores da enzima ACCase (fenoxaprope-p-etílico, fenoxaprope-p-etílico + isoxadifen, diclofope-metílico, clodinafope-propargil, cialofope, setoxidim), inibidores da enzima ALS (imazetapir, penoxsulam), inibidor da enzima EPSPS (glifosato), mimetizador de auxina (quincloraque), inibidor do FSI (paraquate) e FSII (propanil). As gerações G0 e G2 selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen foram tratadas com estes herbicidas no estágio de três a quatro folhas, nas doses descritas na Tabela 1. As doses foram definidas a partir de experimentos prévios com aplicações de doses de 25, 50 e 75% da dose recomendada de cada herbicida em quatro plantas de cada biótipo (dados não apresentados). Cada herbicida foi aplicado em uma população média de 49 plantas de cada geração, distribuídas em bandejas preenchidas com solo. O número de plantas de capim-arroz presentes em cada bandeja foi mensurado antes da aplicação dos herbicidas e o número de plantas sobreviventes foi mensurado aos 21 DAA.

TABELA 1. Herbicidas e doses aplicadas em plantas de capim-arroz das gerações G0 e G2-selecionada com os herbicidas fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ, para a caracterização de evolução da resistência cruzada ou múltipla.

Herbicida	Produto comercial	Mecanismo de ação	Dose recomendada (g ha ⁻¹)	Adjuvante (0,5% v/v)	Dose aplicada (g ha ⁻¹)	
					MOST	CAMAQ
Fenoxaprope-p-etílico	Podium® EW	Inib. ACCase	69	-	17,25	20
Fenoxaprope-p-etílico + isoxadifen	Starice®	Inib. ACCase	69	Aureo	17,25	20
Diclofope-metílico	Iloxan CE	Inib. ACCase	852	Veget'Oil	298	298
Clodinafope-propargil	Topik® 240 EC	Inib. ACCase	24	Assist	18	9
Cialofope-butílico	Clincher®	Inib. ACCase	228	Veget'Oil	57	57
Setoxidim	Poast®	Inib. ACCase	184	Assist	92	92
Imazetapir	Imazetapir Plus Nortox	Inib. ALS	100	Dash	30	200
Penoxsulam	Ricer®	Inib. ALS	48	Veget'Oil	48	48
Quincloraque	Facet®	Mim. auxina*	375	Assist	262,5	375
Glifosato	Roundup Original Di	Inib. EPSPS	740	-	370	185
Paraquate	Gramoxone® 200	Inib. FSI	300	-	75	75
Propanil	Stam 800 WG	Inib. FSII	3600	-	3600	3600

* Mecanismo de inibição de parede celular em gramíneas. Inib. ACCase – inibidor da enzima Acetil CoA Carboxilase; Inib. ALS – Inibidor da enzima Acetolactato Sintase; Mim. auxina – mimetizador de auxina; Inib. EPSPS – inibidor da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato-sintase; Inib. FSI e FSII – inibidor do fotossistema I e II, respectivamente.

3.2.5.1 Caracterização da evolução da resistência cruzada ou múltipla por metabolização através de inibidores de metabolização

Os tratamentos herbicidas que apresentaram maior diferença significativa no teste qui-quadrado (χ^2) da evolução da resistência cruzada da geração G0 e G2 foram escolhidos para realizar curvas de dose-resposta com e sem o uso do inibidor de metabolização malathion. Os herbicidas escolhidos para este estudo foram o quincloraque e diclofope para o biótipo MOST e quincloraque e cialofope para o biótipo CAMAQ. Os experimentos foram realizados em esquema trifatorial ($3 \times 2 \times 8$) em delineamento inteiramente casualizado. O fator A foi composto pelas gerações de seleção G0, G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen. O fator B foi constituído pela aplicação ou não do inibidor malathion e o fator C foi constituído por oito doses de cada herbicida. As doses utilizadas para o herbicida quincloraque foram de 0; 18,75; 37,5; 75; 150; 225 (apenas para MOST); 300; 375 e 750 g ha⁻¹ (apenas para CAMAQ), para o herbicida diclofope foram de

0; 21,3; 42,6; 85,2; 170,4; 340,8; 681,6; 852 g ha⁻¹ e para o herbicida cialofope 0; 4,5; 9; 18; 36; 72; 144; 180 g ha⁻¹. A aplicação do inibidor malathion foi realizada duas horas antes da aplicação das doses dos herbicidas na dose de 1000g ha⁻¹.

3.2.7 Análise dos dados

O *software* estatístico R v.3.5.3 foi utilizado para a análise dos dados (R Core Team, 2019). Os dados obtidos dos experimentos de curvas de dose-respostas foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e à análise de variância (ANOVA) usando o pacote *Expdes.pt*. Os comandos *plot(fitted(x))*, *resid(x)* e *qqnorm* do pacote *drc* foram utilizados para verificação da distribuição da normalidade dos resíduos. Os dados foram ajustados pelo modelo log-logístico de 4 parâmetros utilizando o comando *modelFit* (Ritz *et al.*, 2015). As doses dos herbicidas que causaram redução de 50% no controle visual (C₅₀) e redução de 50% na massa fresca ou seca da parte aérea (GR₅₀) foram estimadas utilizando o modelo:

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \exp[b(\log x - \log e)]}$$

onde: *c* e *d* são as assíntotas de mínima e máxima resposta da curva, *b* é a inclinação da curva, *e* é a dose que causa 50% de redução na resposta de *y* (C₅₀ ou GR₅₀) e *x* é a dose do herbicida. Quando as doses não foram suficientes para o controle de 100% das plantas, o C₅₀ foi calculado substituindo o valor de *y* por 50. A diferença entre o comportamento das curvas entre os herbicidas fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen nos experimentos foi calculada através do fator de resistência (FR). A diferença estatística entre os FR das variáveis controle aos 21 DAA (C₅₀), massa fresca da parte aérea (GR₅₀) e massa seca da parte aérea (GR₅₀) foram calculadas utilizando o comando *EDcomp* do pacote *drc*. Os gráficos foram realizados utilizando o pacote *ggplot2* (Wickham, 2016) e os intervalos de confiança de cada curva foram calculados através do comando *predict* e plotados em toda a curva, conforme recomendado por Ritz *et al.* (2015). Os dados de percentagem de controle foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

A análise estatística para inferir sobre possível evolução da resistência cruzada ou múltipla foi realizada pela quantificação da diferença de percentagem de sobreviventes entre as gerações G0 e G2 selecionada com fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen de ambos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ. Os valores de sobrevivência foram submetidos à análise do teste χ^2 . A hipótese nula foi que a sobrevivência esperada de capim-arroz após

a aplicação de cada herbicida testado seria igual nas gerações G0 e G2 selecionada. Comparação entre as proporções de sobrevivência da G0 e G2 selecionada foi realizada pelo teste de qui-quadrado de heterogeneidade proposto por Busi e Powles (2017), utilizando o *software* estatístico *R* com o comando *prop.test*, à 5% de probabilidade de erro. Os comandos utilizados para todas as análises estatísticas descritas acima estão dispostos no Apêndice 1.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Definição de subdoses

A interação entre os fatores herbicida (formulado ou não com isoxadifen) e doses foi significativa para as variáveis controle aos 21 DAA, massa fresca e massa seca para ambos biótipos de capim-arroz (Apêndice 2). Os dados obtidos foram ajustados ao modelo logístico de quatro parâmetros. O controle dos biótipos de capim-arroz (Figura 2A e B) foi maior que 90% com 27,6 g de fenoxaprope (40% da dose recomendada), mesmo usando fenoxaprope formulado com isoxadifen. Isto caracteriza que ambos os biótipos são suscetíveis a este herbicida. O valor de C_{50} para MOST usando fenoxaprope sem protetor foi de 15,2g e de 18,1g quando formulado com o protetor isoxadifen (Tabela 2). Esse resultado demonstra pequeno efeito do protetor no controle do biótipo, apresentando um fator de resistência de 1,19. Para o biótipo CAMAQ não foi verificada diferença significativa no uso do protetor isoxadifen formulado com o herbicida fenoxaprope para a variável controle visual, embora o valor de C_{50} tenha sido maior quando usado fenoxaprope formulado com o protetor (18,9g) comparando com apenas o ingrediente ativo (16,9 g) (Tabela 2).

As variáveis massa fresca (Figura 2B e C) e massa seca da parte aérea (Figura 2D e E) apresentaram comportamento semelhante para ambos os biótipos. A redução destas variáveis foi de aproximadamente 100% quando comparado com o tratamento controle com a dose de 27,6 g de fenoxaprope com ou sem isoxadifen (Tabela 2). No entanto, verifica-se que a redução destas variáveis para o biótipo CAMAQ foi menor nas doses iniciais quando usado o herbicida fenoxaprope formulado com o protetor. Esse resultado é verificado analisando o valor de GR_{50} deste biótipo para as variáveis massa fresca e seca da parte aérea (Tabela 2). A adição do protetor isoxadifen aumentou o GR_{50} da massa fresca da parte aérea de 7,1 g para 12,0g de fenoxaprope, apresentando valor significativo do FR de 1,6 (Tabela 2). Isso ocorreu também para o valor de GR_{50} relacionado à variável massa seca, aumentando a dose de 11,7g para 15,9g quando usado isoxadifen, proporcionando valor significativo do FR de 1,3 (Tabela 2).

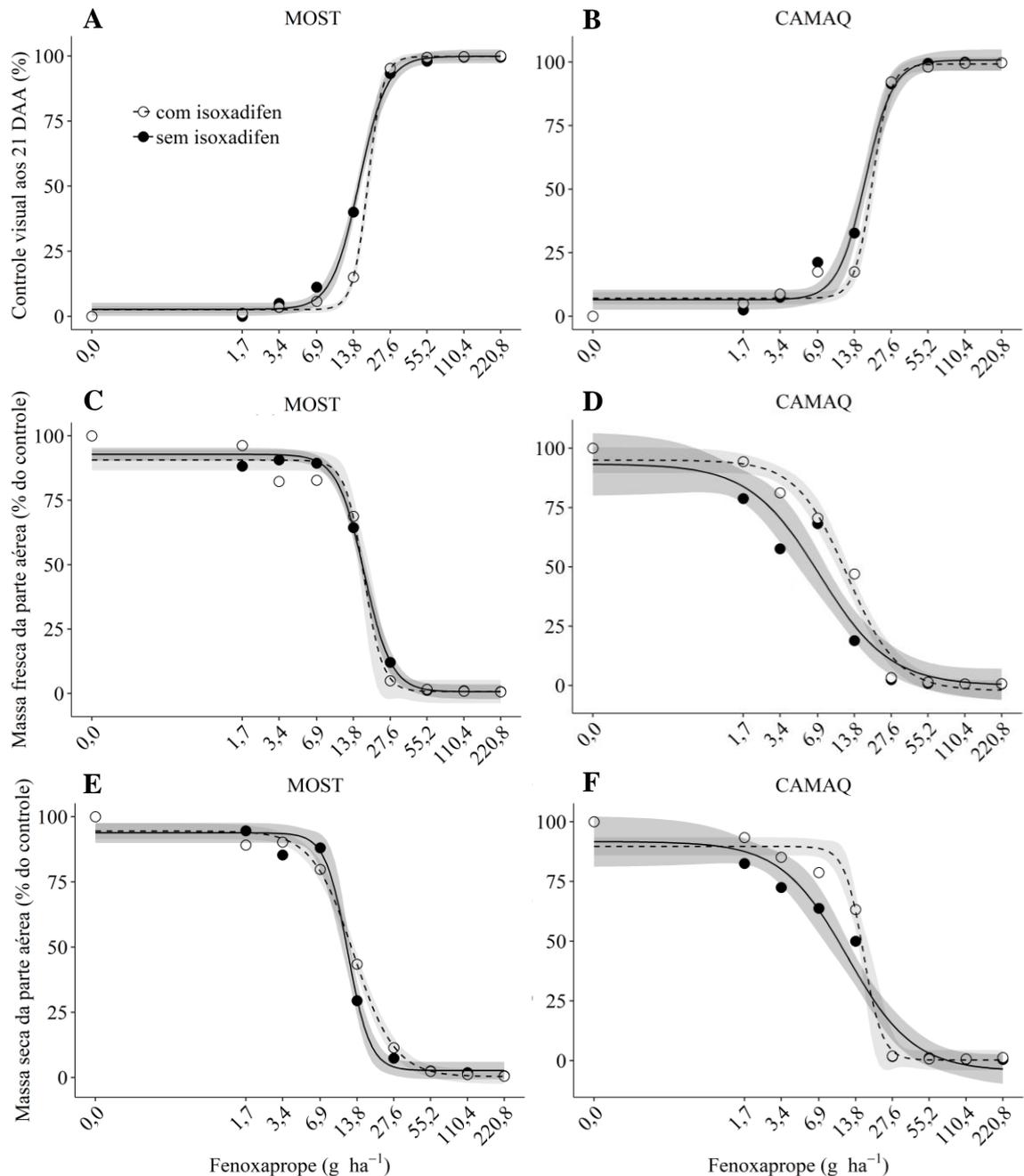


FIGURA 2. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B), massa fresca (% do controle) (C e D) e massa seca da parte aérea (% do controle) (E e F) dos biótipos de capim-arroz MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e E) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprop com e sem o protetor isoxadifen. Intervalo de confiança de 95% de probabilidade está representado na cor cinza para cada curva.

Os biótipos MOST e CAMAQ foram caracterizados como suscetíveis aos herbicidas fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen. A adição do protetor isoxadifen apresentou pequeno efeito apenas em subdoses (Figura 2), principalmente nas variáveis massa fresca e seca da parte aérea para o biótipo CAMAQ (Tabela 2). Outros protetores associados com herbicidas causaram também uma diminuição da sensibilidade de plantas daninhas pelo herbicida. Populações de *Lolium* sp. apresentaram redução de até 44 % no controle para o

herbicida piroxsulam e iodosulfuron + mesosulfuron com os protetores cloquintocet e mefenpir, respectivamente (Duhoux *et al.*, 2017b). Dentre outros protetores, isoxadifen e cloquintocet associados com o herbicida topamezone diminuíram o controle de *Agrostis stolonifera* em análise de curva de dose-resposta (Elmore *et al.*, 2015). O controle de *Alopecurus myosuroides* foi reduzido pelo herbicida fenoxaprope devido a associação dos protetores fenclorazole e mefenpir (Cummins *et al.*, 2009). Essa diminuição da sensibilidade quando utilizado protetores associados aos herbicidas está relacionada com um aumento da metabolização induzida pelos protetores (Rosinger *et al.*, 2014), o que também pode explicar os resultados obtidos neste experimento.

A partir destes resultados, a maior dose de cada herbicida que não apresentou controle total das plantas e mais duas maiores foram utilizadas para a seleção das gerações das plantas de capim-arroz e para análise da sobrevivência. Para o biótipo MOST as doses escolhidas foram 13,8; 17,25 e 20,7g de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen (20, 25 e 30 % da dose recomendada) e para o biótipo CAMAQ 6,9; 13,8 e 20,7g de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen (10, 20 e 30 % da dose recomendada).

TABELA 2. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e massa seca da parte aérea para os biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ submetidas às diferentes doses dos herbicidas fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Biótipo	Herbicida	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle aos 21 DAA-----							
MOST	fenoxaprope	-3,8	2,4	99,8	15,2	±1,6	-
	fenoxaprope + isoxadifen	-7,1	2,7	99,7	18,1	±1,1	1,19
CAMAQ	fenoxaprope	-3,8	6,45	100,8	16,9	±1,3	-
	fenoxaprope + isoxadifen	-6,5	7,73	99,1	18,9	±1,8	1,12
-----massa fresca da parte aérea-----							
MOST	fenoxaprope	3,9	0,67	92,8	16,8	±1,4	-
	fenoxaprope + isoxadifen	5,6	0,73	90,5	16,7	±1,5	0,99
CAMAQ	fenoxaprope	1,5	-0,2	93,4	7,1	±2,2	-
	fenoxaprope + isoxadifen	2,09	-2,14	94,9	12,0	±2,3	1,69*
-----massa seca da parte aérea-----							
MOST	fenoxaprope	4,7	2,6	93,7	11,5	±0,8	-
	fenoxaprope + isoxadifen	2,5	0,3	94,4	12,9	±1,2	1,12
CAMAQ	fenoxaprope	1,6	-4,3	91,6	11,7	±2,8	-
	fenoxaprope + isoxadifen	5,6	0,2	89,6	15,9	±1,7	1,36*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca ou massa seca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo tratado com fenoxaprope + isoxadifen/C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo tratado com fenoxaprope.
*p<0,05

3.3.2 Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 dos biótipos de capim-arroz

A sobrevivência das plantas da geração G0 e G1 para o biótipo MOST foi maior quando a aplicação do herbicida fenoxaprope foi associada com o protetor isoxadifen (Tabela 3). Para a geração G2, a aplicação de fenoxaprope com isoxadifen proporcionou maior controle nas plantas deste biótipo. Este resultado é observado pela sobrevivência de 6,8% de plantas após aplicação de fenoxaprope + isoxadifen comparado com sobrevivência de 22,9% após aplicação de fenoxaprope na dose de 20,7g (Tabela 3). Em geral, houve maior sobrevivência das plantas de capim-arroz nas gerações G2 selecionadas com ambos os herbicidas.

TABELA 3. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo MOST em relação à aplicação de subdoses do herbicida fenoxaprope associado ou não ao protetor isoxadifen.

Herbicida	G*	Dose aplicada (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Plantas aplicadas	Sobrevivência (%)	Plantas selecionadas
Fenoxaprope	0	13,8 (20)	149	10,9	15
	0	17,25 (25)	172	3,4	-
	0	20,7 (30)	158	1,2	-
	1	13,8 (20)	208	27,0	-
	1	17,25 (25)	233	10,3	15
	1	20,7 (30)	247	0,0	-
	2	13,8 (20)	208	56,7	-
	2	17,25 (25)	191	42,6	-
	2	20,7 (30)	163	22,8	-
Fenoxaprope + isoxadifen	0	13,8 (20)	165	19,6	-
	0	17,25 (25)	173	13,8	15
	0	20,7 (30)	159	2,4	-
	1	17,25 (25)	140	17,6	15
	1	20,7 (30)	100	1,0	-
	1	24,15 (35)	112	0,0	-
	2	13,8 (20)	186	35,7	-
	2	17,25 (25)	172	24,2	-
	2	20,7 (30)	176	6,8	-

*Gerações de seleção.

As plantas selecionadas tanto com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen do biótipo CAMAQ apresentaram aumento de sobrevivência em relação a G0 (Tabela 4). A adição de isoxadifen na aplicação de fenoxaprope proporcionou maior sobrevivência para este biótipo. Na geração G2 quando aplicado 27,6g de fenoxaprope + isoxadifen houve

sobrevivência de 5,4% de plantas em comparação com 0,42 % de sobrevivência na aplicação apenas de fenoxaprope (Tabela 4). A maior sobrevivência de plantas daninhas após à aplicação de herbicida formulado com protetor também foi verificada com a espécie *Lolium* sp. O protetor cloquintocet foi responsável pelo aumento de sobrevivência de 0,0% para 28% de *Lolium* sp. após a aplicação de piroxsulam (Duhoux *et al.*, 2017b). Estes resultados demonstram a existência de aumento da sobrevivência de capim-arroz após aplicações de subdoses de fenoxaprope, principalmente quando associado com isoxadifen.

TABELA 4. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de subdoses do herbicida fenoxaprope associado ou não ao protetor isoxadifen.

Herbicida	G*	Dose aplicada (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Plantas aplicadas	Sobrevivência (%)	Plantas selecionadas
Fenoxaprope	0	6,9 (10)	169	86,5	-
	0	13,8 (20)	179	36,4	15
	0	20,7 (30)	163	5,6	-
	1	13,8 (20)	230	12,4	15
	1	20,7 (30)	218	1,4	-
	1	27,6 (40)	232	0,0	-
	2	13,8 (20)	235	52,0	-
	2	20,7 (30)	258	8,5	-
	2	27,6 (40)	234	0,4	-
Fenoxaprope + isoxadifen	0	6,9 (10)	182	93,3	-
	0	13,8 (20)	176	33,3	15
	0	20,7 (30)	183	2,7	-
	1	13,8 (20)	223	15,6	-
	1	20,7 (30)	212	1,8	4
	1	27,6 (40)	224	1,3	-
	2	13,8 (20)	316	23,6	-
	2	20,7 (30)	196	7,2	-
	2	27,6 (40)	211	5,4	-

*Gerações de seleção.

A maior sobrevivência de plantas após aplicações de subdoses de herbicidas, como ocorrido no presente trabalho, independente da presença do protetor em conjunto com o herbicida, ocorre devido ao ganho de metabolização por enzimas de detoxificação (Neve e Powles, 2005a; Powles e Yu, 2010). As plantas contêm genes codificantes de enzimas de detoxificação que, mesmo sendo suscetíveis, apresentam capacidade de metabolizar herbicida quando aplicados em doses baixas (Yu e Powles, 2014). Este aumento da sobrevivência nas plantas está provavelmente sendo ocasionado pela maior capacidade de

metabolização por enzimas do citocromo P450, GST, GT entre outras (Yu *et al.*, 2013). Os protetores agem ativando estes genes de metabolização, o que pode ter ocorrido nas gerações selecionadas com fenoxaprope associado ao protetor isoxadifen do biótipo CAMAQ.

3.3.3 Curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada

A interação entre os fatores geração e dose dos herbicidas fenoxaprope ou fenoxaprope + isoxadifen foram significativas para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e massa seca da parte aérea para os biótipos MOST e CAMAQ (Apêndice 3). O controle das plantas de capim-arroz do biótipo MOST e CAMAQ da geração G2 selecionada com fenoxaprope foi significativamente menor em relação as plantas das gerações G0 e G2 controle após aplicação de doses de fenoxaprope (Figura 3, 4, 5A e C). Do mesmo modo, o controle de plantas da geração G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen foi reduzido após aplicação deste herbicida para ambos os biótipos estudados (Figura 3, 4, 5B e D).

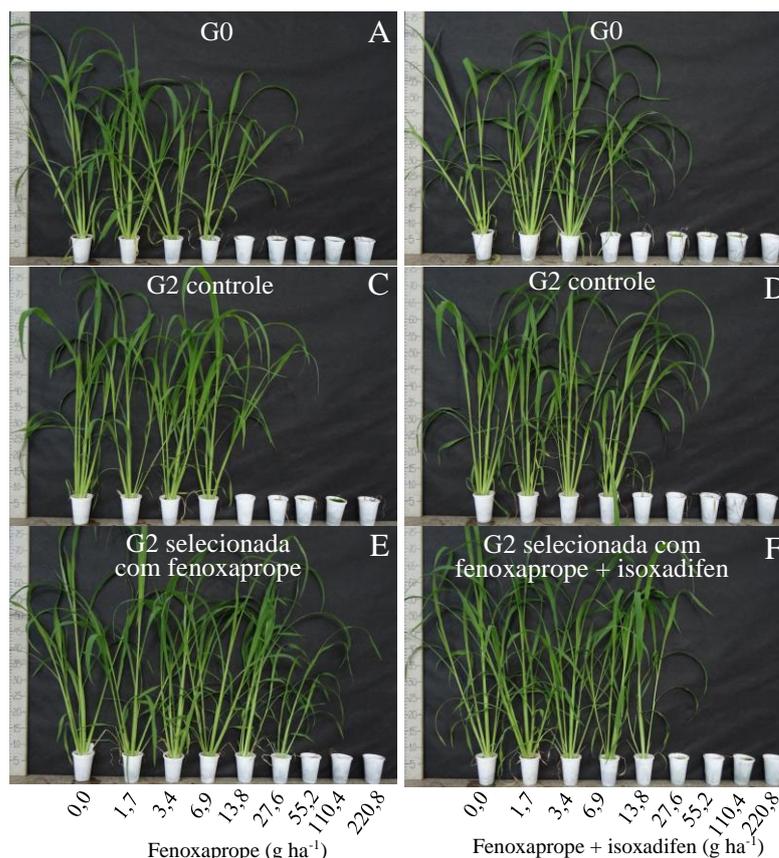


FIGURA 3. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo MOST das plantas G0 (A, B), G2 controle (C e D) e G2 selecionada com fenoxaprope (E) e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen (F) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprope (A, C e E) e fenoxaprope + isoxadifen (B, D e F). Fotos aos 21 DAA.

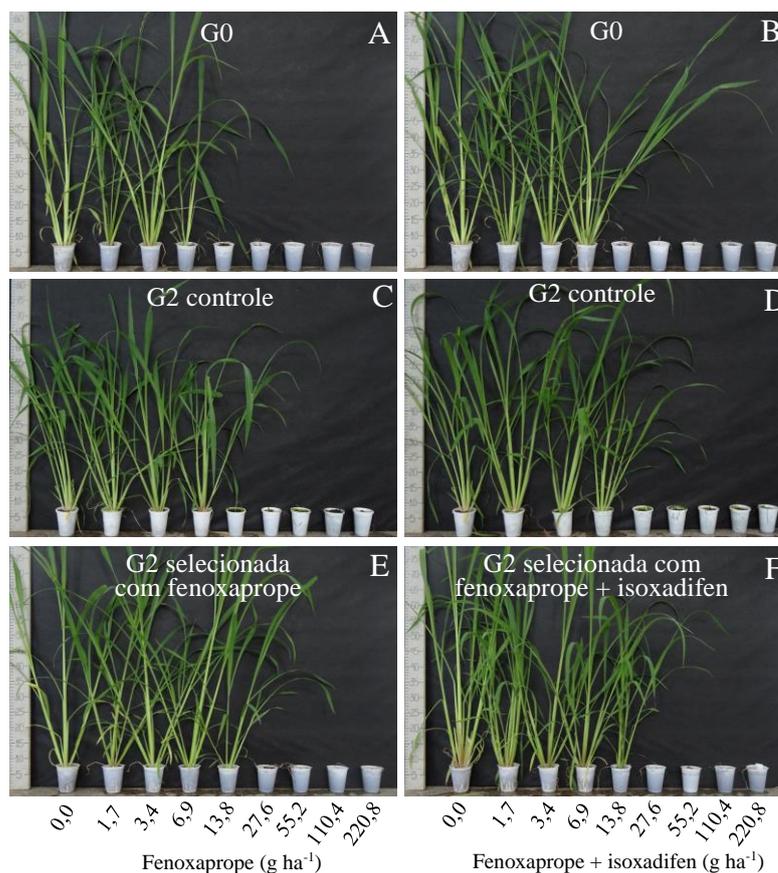


FIGURA 4. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo CAMAQ das plantas G0 (A, B), G2 controle (C e D) e G2 selecionada com fenoxaprop (E) e G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen (F) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprop (A, C e E) e fenoxaprop + isoxadifen (B, D e F). Fotos aos 21 DAA.

A dose para reduzir 50% a variável controle visual para o biótipo MOST após aplicação de fenoxaprop foi de $8,8 \text{ g ha}^{-1}$ para G0 e de $20,1 \text{ g ha}^{-1}$ para G2 selecionada com fenoxaprop, resultando em FR significativo de 2,3 (Tabela 5). Para o herbicida fenoxaprop + isoxadifen, o mesmo resultado foi verificado, embora em maior proporção. O C_{50} da G0 foi de $4,6 \text{ g ha}^{-1}$ e da G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen foi de $15,1 \text{ g ha}^{-1}$, resultando em FR maior de 3,3 (Tabela 5). O valor de C_{50} da G0 e G2 controle do biótipo CAMAQ foi entre $8,2$ e $9,6 \text{ g ha}^{-1}$ para a aplicação de ambos os herbicidas. O valor de C_{50} para a geração G2 selecionada com fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen aumentou para $18,3$ e $17,5 \text{ g ha}^{-1}$, respectivamente. Essas doses comparadas com a C_{50} das gerações G0 resultaram em FR significativo de 2,2 e 1,8, respectivamente para G2 selecionada com fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen, demonstrando redução do controle nas plantas das gerações selecionadas (Tabela 5).

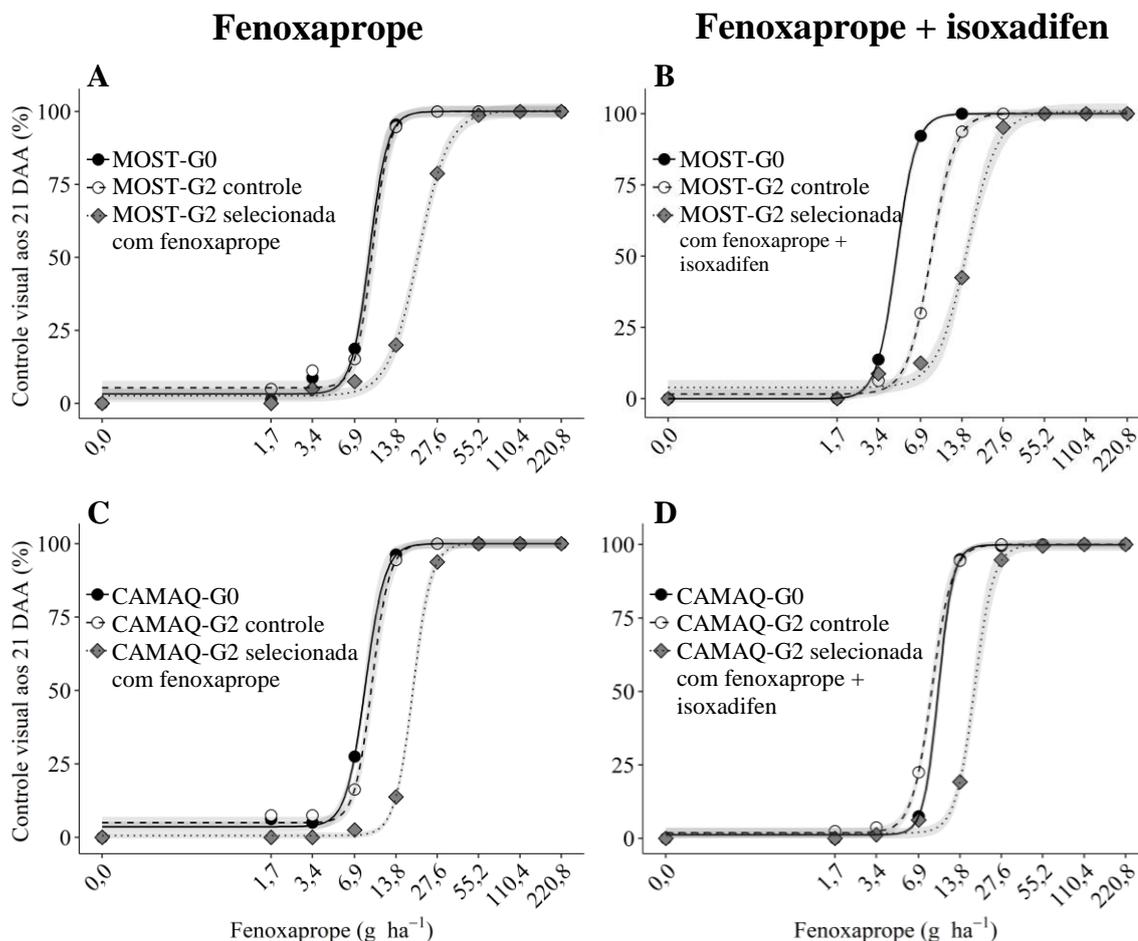


FIGURA 5. Controle visual aos 21 DAA (%) das plantas das gerações de seleções dos biótipos de capim-arroz MOST (A e B) e CAMAQ (C e D) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprop (A e C) e fenoxaprop + isoxadifen (B e D). Intervalo de confiança de 95% de probabilidade está representado na cor cinza para cada curva.

A massa fresca da parte aérea apresentou resultados similares. As plantas da geração G2 selecionadas com fenoxaprop dos biótipos MOST e CAMAQ (Figura 6A e C) atingiram o valor de GR₅₀ nas doses de 16,8 e 16,1 g ha⁻¹ e as plantas da geração G0 nas doses de 8,0 e 7,9 g ha⁻¹, respectivamente para os biótipos (Tabela 6). Os fatores de resistência para MOST e CAMAQ foram de 2,1 e 2,0, respectivamente. Para o herbicida fenoxaprop + isoxadifen verificou-se que o fator de resistência para o biótipo MOST foi maior. Para este biótipo a dose que atingiu o GR₅₀ da geração G0 e G2 controle e G2 selecionado com fenoxaprop + isoxadifen foi de 5,8 e 8,3, e 13,1 g ha⁻¹, respectivamente, resultando em FR de 2,4 em relação a G0. Resultado similar ocorreu para o biótipo CAMAQ, em que as plantas da geração G2 selecionadas com fenoxaprop + isoxadifen apresentaram FR de 1,9 (Tabela 6).

A variável massa seca da parte aérea apresentou resultados similares aos da variável massa fresca descritos acima (Apêndice 4). As gerações G2 que foram selecionadas tanto com o herbicida fenoxaprop quanto com fenoxaprop + isoxadifen apresentaram valores de

GR₅₀ da massa seca maiores do que as gerações G0 e G2 controle para ambos os biótipos, resultando em FR significativos (Apêndice 4).

TABELA 5. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável controle visual aos 21 DAA das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionadas submetidas às diferentes doses de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Biótipo	Geração	Herbicida aplicado	b	c	d	C ₅₀		FR
						Dose (g ha ⁻¹)	IC	
MOST	G0	fenoxaprope	-6,6	3,2	100,0	8,8	±0,5	-
	G2 controle		-22,9	5,3	99,1	7,5	±6,4	0,8
	G2 selecionada com fenoxaprope		-3,9	2,6	100,2	20,1	±1,0	2,3*
	G0	fenoxaprope + isoxadifen	-6,1	-0,1	100,0	4,6	±0,2	-
	G2 controle		-4,9	1,6	100,1	8,2	±0,3	1,8*
	G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen		-3,9	3,9	100,8	15,1	±0,6	3,3*
CAMAQ	G0	fenoxaprope	-6,2	3,5	100,0	8,2	±0,2	-
	G2 controle		-6,8	4,9	100,0	9,2	±0,6	1,1
	G2 selecionada com fenoxaprope		-6,5	0,5	100	18,3	±0,7	2,2*
	G0	fenoxaprope + isoxadifen	-8,1	1,2	99,8	9,5	±0,4	-
	G2 controle		-5,9	1,9	100,0	8,6	±0,5	0,9
	G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen		-6,3	1,7	99,9	17,5	±0,7	1,8*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ da G2 controle (não selecionada) ou G2 selecionada/C₅₀ da G0 (não selecionada) dentro de cada biótipo e herbicida. *p<0,05 pelo teste F.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o controle das gerações G2 de ambos os biótipos selecionadas com os herbicidas fenoxaprope associado ou não com o protetor isoxadifen, foi menor e significativo em comparação as plantas da geração G0 e G2 não selecionada. A sobrevivência de plantas daninhas a partir do uso de subdoses de herbicidas proporciona a diminuição do controle das suas progênes (Neve e Powles, 2005b). Isto ocorre pelo fato de que a aplicação de subdoses de herbicida age na variação genética da população de plantas daninhas, permitindo a sobrevivência de plantas que apresentam capacidade de metabolizar pequenas doses (Busi *et al.*, 2013). O estudo de Busi *et al.*, (2013) foi um dos primeiros a avaliar a evolução da resistência aos herbicidas em função de

subdoses ao longo de gerações de seleções. Esse estudo avaliou apenas a sobrevivência das plantas e as avaliações de crescimento não foram apresentadas.

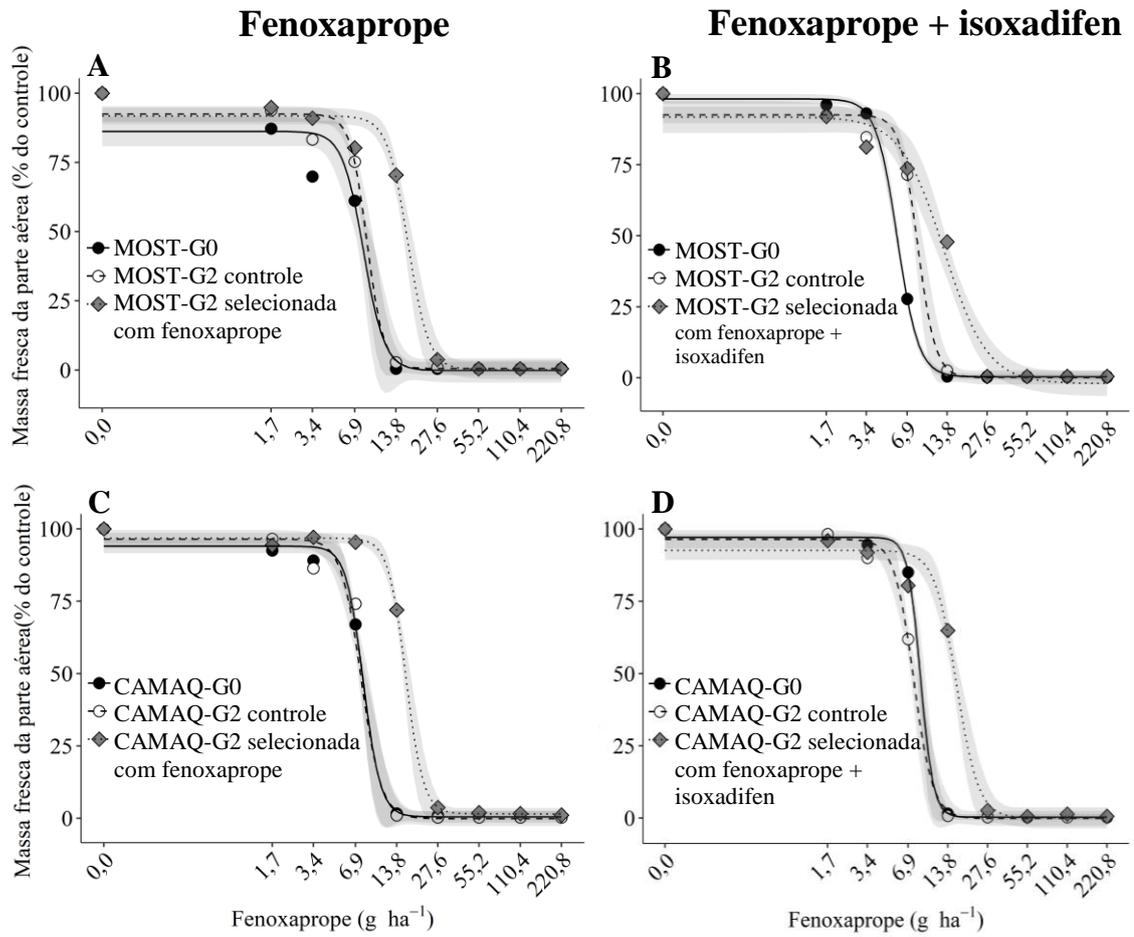


FIGURA 6. Massa fresca da parte aérea (% do controle) das plantas das gerações de seleções dos biótipos de capim-arroz MOST (A e B) e CAMAQ (C e D) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprop (A e C) e fenoxaprop + isoxadifen (B e D). Intervalo de confiança de 95% de probabilidade está representado na cor cinza para cada curva.

A capacidade marginal de metabolizar pequenas doses de herbicidas está relacionada à maior expressão de genes de pequenos efeitos em plantas sobreviventes, que a partir de cruzamentos poderão recombinar alelos e empilhar essas características para suas progênies formando um caráter poligênico (Yu e Powles, 2014). Essa maior metabolização está relacionada principalmente à maior expressão de genes envolvidos na metabolização como os da família P450 e GST (Yu e Powles, 2014). Em uma população de plantas daninhas pode existir grande diversidade na capacidade de metabolização de herbicidas, embora, esta característica muitas vezes não seja suficiente para metabolizar os herbicidas na dose recomendada (Neve e Powles, 2005a). Assim, a seleção de plantas com subdoses proporciona o empilhamento dessas características nas suas progênies que em poucas

gerações de seleção aumentam a capacidade de metabolizar herbicidas (Neve e Powles, 2005b; Busi *et al.*, 2016).

TABELA 6. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada submetidas às diferentes doses de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Biótipo	Geração	Herbicida aplicado	b	c	d	GR ₅₀		FR
						Dose (g ha ⁻¹)	IC	
MOST	G0	fenoxaprope	5,6	-0,1	86,2	8,0	±0,7	-
	G2 controle		7,1	0,6	92,5	8,5	±1,0	1,0
	G2 selecionada com fenoxaprope		5,8	0,1	91,8	16,8	±1,5	2,1*
	G0	fenoxaprope + isoxadifen	5,5	0,4	98,1	5,8	±0,4	-
	G2 controle		6,6	0,1	92,5	8,3	±0,8	1,4*
	G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen		2,7	-2,0	91,8	13,1	±1,3	2,4*
CAMAQ	G0	fenoxaprope	6,9	0,5	94,0	7,9	±0,6	-
	G2 controle		7,9	0,1	94,3	8,1	±0,9	1,0
	G2 selecionada com fenoxaprope		6,8	1,5	96,8	16,1	±1,2	2,0*
	G0	fenoxaprope + isoxadifen	9,0	0,3	97,1	8,6	±1,3	-
	G2 controle		6,0	-0,1	96,4	7,6	±0,4	0,9
	G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen		5,2	0,1	92,5	16,0	±0,9	1,9*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = GR₅₀ da G2 controle (não selecionada) ou G2 selecionada/C₅₀ da G0 (não selecionada) dentro de cada biótipo e herbicida. *p<0,05 pelo teste F.

A velocidade de evolução da resistência aos herbicidas a partir da aplicação de subdoses é diferente entre espécies de polinização cruzada e autopolinização. Como observado no presente estudo, em duas gerações de seleção o FR foi de 2,3 até 3,3 quando usada as subdoses de fenoxaprope ou fenoxaprope + isoxadifen em relação às plantas da geração G0 (Tabela 5). Embora o fator de resistência seja considerado baixo, esse aumento de dose para atingir o C₅₀ nas gerações G2 selecionadas foi significativo. Nesse caso, vale ressaltar que *E. crus-galli* é uma espécie autógama e apresenta limitações na recombinação genética (Kreiner *et al.*, 2018). Devido a isto, espera-se que a evolução para resistência aos herbicidas nessas espécies ocorra de forma mais lenta em comparação a uma espécie de polinização cruzada, que apresenta alto nível de variação genética na população inicial (Kreiner *et al.*, 2018). No entanto, em trabalhos com *E. crus-galli* foi verificado que a espécie pode apresentar percentual de polinização cruzada de até 5% quando as plantas estão

separadas por distâncias menores que 0,25m (Bagavathiannan e Norsworthy, 2014). Esse percentual de polinização cruzada em espécies autógamas pode ser ainda maior como forma de resposta da planta a algum estresse ambiental ou de competição (Munoz *et al.*, 2016), como a aplicação de subdoses de herbicida no presente trabalho. As plantas selecionadas de capim-arroz após a aplicação das subdoses foram mantidas juntas para a multiplicação das sementes. Portanto, pequeno percentual de cruzamento entre as plantas selecionadas de capim-arroz não pode ser descartado e uma percentagem pequena de recombinação gênica pode ter acontecido. Apenas outro trabalho estudou a evolução da resistência em espécie autógama como a *Avena fatua* (Busi *et al.*, 2016). Essa espécie, assim como *E. crus-galli*, também é hexaploide e, a partir da seleção com subdoses de diclofope, sua terceira geração de seleção apresentou menor controle resultando em fator de resistência de 2,3 (Busi *et al.*, 2013). Esse valor é considerado moderado quando comparado com a espécie de polinização cruzada *Lolium rigidum* selecionada com subdoses do mesmo herbicida, que apresentou fator de resistência maior que 40 na mesma geração de seleção (Busi *et al.*, 2013; Busi *et al.*, 2016). Em ambos os estudos com *L. rigidum* e *A. fatua* foram avaliados apenas efeitos de subdoses de herbicidas e a interação com protetores não foi estudada.

Os resultados obtidos indicam que *E. crus-galli* apresenta potencial para evoluir para resistência através de seleção de subdoses de herbicidas, no entanto, de forma mais lenta que espécies alógamas. Espécies autógamas apresentam baixa diversidade genética na população e a resistência ocorre devido o baixo número de eventos independentes que podem ocorrer na população inicial (Kreiner *et al.*, 2018). Por isso, a resistência em espécies autógamas é comumente devido à característica monogênica, ou seja, característica única já presente na população inicial de plantas que está sofrendo a pressão de seleção (Busi *et al.*, 2016; Kreiner *et al.*, 2018). Diferentemente ocorre em espécies de polinização cruzada, em que existe grande variabilidade genética inicial e que a resistência aos herbicidas ocorre pelo maior número de eventos independentes dentro de uma população (Kreiner *et al.*, 2018). Somado a isso, a evolução da resistência no capim-arroz verificado no presente trabalho pode também estar atrelado à alguma regulação epigenética devido ao uso contínuo de herbicidas (Markus *et al.*, 2017) e estudos avançados devem ser realizados para verificar estes efeitos.

O uso de subdoses do protetor isoxadifen com fenoxaprope na seleção das gerações proporcionou redução da sensibilidade das plantas de capim-arroz do biótipo MOST na geração G2 comparada com a seleção apenas com fenoxaprope (Tabela 5 e 6). Para o biótipo CAMAQ não se verificou efeito diferente na diminuição do controle entre a seleção das gerações com fenoxaprope associado ou não com protetor, embora houve diminuição significativa da sensibilidade para as plantas G2 selecionadas com ambos os herbicidas em

relação as gerações G0 e G2 controle. Isso demonstra que a especificidade do protetor ocorre não apenas nas culturas (Rosinger, 2014), mas também em biótipos de plantas daninhas. O protetor isoxadifen proporcionou aumento do fator de resistência provavelmente pela ativação de genes que codificam enzimas envolvidas na defesa da planta, como por exemplo, as citocromo P450, GST, GT e também proteínas transportadoras ABC (Powles e Yu, 2010; Riechers *et al.*, 2010; Duhoux *et al.*, 2017b). O protetor isoxadifen já foi identificado na ativação de genes P450, GST e GT na cultura do milho na metabolização de nicosulfuron (Sun *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018). Em outro estudo com milho foi verificado que o isoxadifen aumenta a seletividade da cultura para os herbicidas foramsulfuron e iodosulfuron (Paporisch e Rubin, 2017). Neste estudo, a aplicação do inibidor de P450 malathion proporcionou fitotoxicidade na cultura pela aplicação dos herbicidas, indicando o possível efeito do isoxadifen na maior transcrição de enzimas citocromo P450, o que pode ter ocorrido no presente trabalho.

Os trabalhos sobre a utilização de protetores em plantas daninhas se baseiam praticamente em aplicações únicas do protetor associado ou não com o herbicida estudado. O protetor isoxadifen foi caracterizado em aumentar a tolerância de *Agrostis stolonifera* ao herbicida pinoxaden em aplicações únicas (Elmore *et al.*, 2016). Em *Alopercurus myosuroides* foi verificado que os protetores mefenpir-dietil e fenclorazole-etil aumentaram a degradação do herbicida fenoxaprope-p-etílico pela conjugação com glutathione (Cummins *et al.*, 2009). Os protetores cloquintocet e mefenpir foram identificados como sendo responsáveis pelo menor controle de *Lolium* sp. pelos herbicidas piroxsulam e iodosulfuron + mesosulfuron em análise de curva de dose-resposta (Duhoux *et al.*, 2017b). Os trabalhos, em geral, identificaram o menor controle de plantas daninhas pelo uso de protetores. No entanto, o presente estudo é o primeiro a relatar o efeito da seleção de plantas daninhas com subdoses do herbicida contendo protetor na sua formulação como um fator a mais a proporcionar menor controle de plantas daninhas nas gerações de seleção, como ocorreu para o biótipo MOST (Tabela 5 e 6).

A utilização de subdoses de herbicidas em lavouras é praticamente inerente à prática de aplicação. As plantas podem receber subdoses devido a fatores diretos relacionados com a redução deliberada da dose para baixar o custo de aplicação, ou indiretos, quando é utilizada a dose recomendada, mas a ocorrência de condições ambientais inadequadas, deficiente cobertura e estágio avançado de desenvolvimento da planta, resultam em menor disponibilidade da quantidade do herbicida que efetivamente atinge a planta. Estes fatores podem estar favorecendo a evolução da resistência e, possivelmente, de forma mais rápida quando o herbicida apresenta protetor em sua formulação, como o presente trabalho. O

protetor isoxadifen proporcionou menor controle das plantas da G2 selecionadas com o protetor no biótipo MOST, possivelmente, pela ativação de genes de detoxificação, as quais no início da seleção (G0) não apresentavam essas características de pequenos efeitos de metabolização. Após seleções, suas progênies apresentaram maior capacidade de metabolizar o herbicida fenoxaprope em comparação à utilização apenas do fenoxaprope nas mesmas etapas de seleção. Este resultado ajuda a explicar a existência de biótipos de capim-arroz resistentes ao herbicida fenoxaprope associado ao protetor isoxadifen (Wright *et al.*, 2016). Cabe salientar que o maior efeito do protetor ocorreu no estudo de sobrevivência, que é o fator mais importante em relação ao nível de controle e crescimento. Nos estudos de subdoses, a sobrevivência das plantas é a principal variável a ser analisada pelo fato de representar a capacidade de produzir sementes e infestar uma lavoura. Em relação a isso, o protetor isoxadifen em subdoses também diminuiu o controle das plantas, proporcionando maior número de plantas sobreviventes (Tabela 3 e 4).

3.3.4 Caracterização da evolução para resistência cruzada ou múltipla

Este estudo consistiu da avaliação do efeito potencial da seleção por fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen na evolução da resistência a outros herbicidas inibidores da ACCase e produtos de outros mecanismos de ação. Dentre os herbicidas aplicados em população de plantas, para o biótipo MOST foi identificada diferença nas proporções de sobrevivência entre as gerações para os herbicidas diclofope, quincloraque, glifosato e paraquate (Tabela 7). Para as gerações do biótipo CAMAQ foi verificada diferença nas sobrevivências para os herbicidas fenoxaprope, clodinafope, cialofope, penoxsulam, quincloraque, paraquate e propanil (Tabela 8). Não foi verificada diferença na sobrevivência de plantas entre as gerações G0 e G2 selecionadas para os herbicidas setoxidim e imazetapir (Tabela 7 e 8).

TABELA 7. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen do biótipo MOST em relação à aplicação de herbicidas diferentes dos produtos utilizados na seleção das gerações.

Herbicida	Dose (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Geração	Plantas tratadas	Plantas sobr. (%)	χ^2	p*
Fenoxaprope-p- etfílico	17,25 (25%)	G0 (não selecionada)	49	1 (2,0)	-	1
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	17 (34,0)	14,91	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	49	2 (4,1)	0	1
Fenoxaprope-p- etfílico + Isoxadifen	17,25 (25%)	G0 (não selecionada)	52	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	40	2 (5,0)	0,82	0,363
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	7 (14,0)	5,77	0,016
Diclofop- metílico	298 (35%)	G0 (não selecionada)	50	10 (20,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	26 (52,0)	9,76	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	48	11 (22,9)	0,011	0,916
Clodinafop- propargil	9 (35%)	G0 (não selecionada)	49	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	49	0 (0,0)	-	-
Cialofop- butílico	57 (25%)	G0 (não selecionada)	45	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	49	1 (2,0)	<0,001	1
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	1 (2,0)	<0,001	1
Setoxidim	92 (50%)	G0 (não selecionada)	45	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	49	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	49	0(0,0)	-	-
Imazetapir	30 (30%)	G0 (não selecionada)	47	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	48	1 (2,1)	<0,001	1
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	57	1 (1,7)	<0,001	1
Penoxsulam	48 (100%)	G0 (não selecionada)	48	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	47	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	48	0 (0,0)	-	-
Quincloraque	262,5 (70%)	G0 (não selecionada)	48	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	46	35 (76,1)	54,97	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	25 (50,0)	29,64	<0,001
Glifosato	370 (50%)	G0 (não selecionada)	48	3 (6,2)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	45	19 (42,2)	14,7	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	45	30 (66,6)	34,41	<0,001
Paraquate	75 (25%)	G0 (não selecionada)	50	12 (24,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	47	1 (2,1)	8,19	0,004
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	1 (2,0)	8,84	0,002
Propanil	3600 (100%)	G0 (não selecionada)	50	24 (48,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	51	23 (45,1)	0,008	0,926
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	48	14 (29,2)	2,90	0,088

*Valor p indica a probabilidade de rejeitar a hipótese nula (hipótese nula = sem diferença entre a geração G0 (parental) e as gerações G2 (G2 selecionada com fenoxaprope ou fenoxaprope + isoxadifen). Plantas sobr.: plantas sobreviventes.

TABELA 8. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de herbicidas diferentes dos produtos utilizados na seleção das gerações.

Herbicida	Dose (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Gerações	Plantas tratadas	Plantas sobr. (%)	χ^2	p*
Fenoxaprope-p- etfílico	20 (30%)	G0 (não selecionada)	49	1 (2,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	8 (16,0)	4,26	0,038
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	49	17 (34,7)	15,31	<0,001
Fenoxaprope-p- etfílico + Isoxadifen	20 (30%)	G0 (não selecionada)	50	3 (7,5)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	55	4 (7,2)	0,001	0,99
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	11 (22,0)	4,06	0,043
Diclofope- metílico	298 (35%)	G0 (não selecionada)	37	19 (51,3)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	32 (64,0)	0,92	0,335
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	54	22 (40,7)	0,61	0,43
Clodinafope- propargil	9 (35%)	G0 (não selecionada)	42	11 (26,1)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	48	16 (33,3)	0,25	0,612
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	53	26 (49,0)	4,23	0,039
Cialofope- butílico	57 (25%)	G0 (não selecionada)	40	2 (5,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	47	22 (46,8)	16,87	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	15 (30,0)	7,50	0,006
Setoxidim	92 (50%)	G0 (não selecionada)	50	5 (10,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	55	4 (7,2)	0,02	0,88
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	51	9 (17,6)	0,67	0,41
Imazetapir	200 (20%)	G0 (não selecionada)	50	50 (100,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	49	48 (97,9)	0,001	0,99
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	49 (98,0)	0,001	0,99
Penoxsulam	48 (100%)	G0 (não selecionada)	50	50 (100,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	48	23 (47,9)	32,27	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	49	48 (97,9)	<0,001	0,99
Quincloraque	375 (100%)	G0 (não selecionada)	43	2 (4,6)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	46	27 (65,8)	8,34	<0,001
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	41	14 (30,4)	32,12	0,0038
Glifosato	185 (25%)	G0 (não selecionada)	40	16 (40,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	49	25 (51,0)	0,67	0,41
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	33 (66,0)	2,95	0,08
Paraquate	75 (25%)	G0 (não selecionada)	39	5 (12,8)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	48	0 (0,0)	4,37	0,03
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	50	0 (0,0)	4,58	0,032
Propanil	3600 (100%)	G0 (não selecionada)	46	33 (71,7)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	46	22 (47,8)	4,52	0,033
		G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	45	29 (64,4)	0,27	0,6

*Valor p indica a probabilidade de rejeitar a hipótese nula (hipótese nula = sem diferença entre a geração G0 (parental) e as gerações G2 (G2 selecionada com fenoxaprope ou fenoxaprope + isoxadifen). Plantas sobr.: plantas sobreviventes

Inicialmente foi avaliada a resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ACCase, fenoxaprop, diclofop, clodinafop, cialofop e setoxidim. A sobrevivência da geração G2 selecionada com fenoxaprop após aplicação desse herbicida para os biótipos MOST e CAMAQ foi de 34% e 16%, significativamente maior do que a geração G0 (Tabela 7 e 8) (Figura 7). Essa resposta corrobora os resultados encontrados no estudo de curva de dose-resposta, em que a seleção com este herbicida proporcionou aumento na tolerância nas plantas da G2 selecionadas. Além disso, houve menor controle da geração G2 de CAMAQ selecionada com fenoxaprop + isoxadifen, possivelmente pelo efeito do protetor (Tabela 8). Os resultados foram semelhantes para o herbicida fenoxaprop aplicado com isoxadifen. As gerações G2 selecionadas com esse herbicida de ambos os biótipos apresentaram sobrevivência maior em relação à geração G0 (Tabela 7 e 8) (Figura 8). Para o herbicida diclofop observou-se que a dose aplicada de 298 g ha⁻¹ não foi suficiente para controlar as plantas. No entanto, as plantas da G2 selecionada com fenoxaprop no biótipo MOST apresentaram maior sobrevivência, indicando potencial de evolução para resistência a esse herbicida (Figura 9 e Tabela 7). Do mesmo modo, maior sobrevivência foi verificada ao clodinafop nas plantas G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen e, de forma mais pronunciada, ao herbicida cialofop nas plantas da G2 selecionada com fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen no biótipo CAMAQ (Tabela 8 e Figura 10). Não houve diferença na sobrevivência entre as gerações após a aplicação do herbicida setoxidim para ambos os biótipos de capim-arroz (Tabela 7 e 8).

A avaliação do potencial para evolução da resistência múltipla foi avaliada em relação aos herbicidas imazetapir, penoxsulam, quincloraque, glifosato, paraquate e propanil. A aplicação da dose recomendada dos herbicidas inibidores da ALS imazetapir e penoxsulam não proporcionaram o controle das plantas da geração G0 do biótipo CAMAQ, devido a este biótipo ser resistente por metabolização a este mecanismo de ação (Tabela 8). No entanto, houve menor sobrevivência nas plantas da geração G2 quando foram selecionadas com fenoxaprop. Este resultado indica uma reversão da resistência ao herbicida penoxsulam após duas gerações de seleção com herbicida inibidor da ACCase. A aplicação de fenoxaprop sem o protetor nas gerações, possivelmente, selecionou diferentes enzimas P450 e diminuiu a frequência de alelos dos genes codificantes de enzimas capazes de metabolizar o penoxsulam. Este é o primeiro caso de reversão de resistência ao herbicida através de seleção com subdoses de herbicida de mecanismo de ação diferente. Estudos de curva de dose-resposta deverão ser realizados para verificar melhor este efeito.

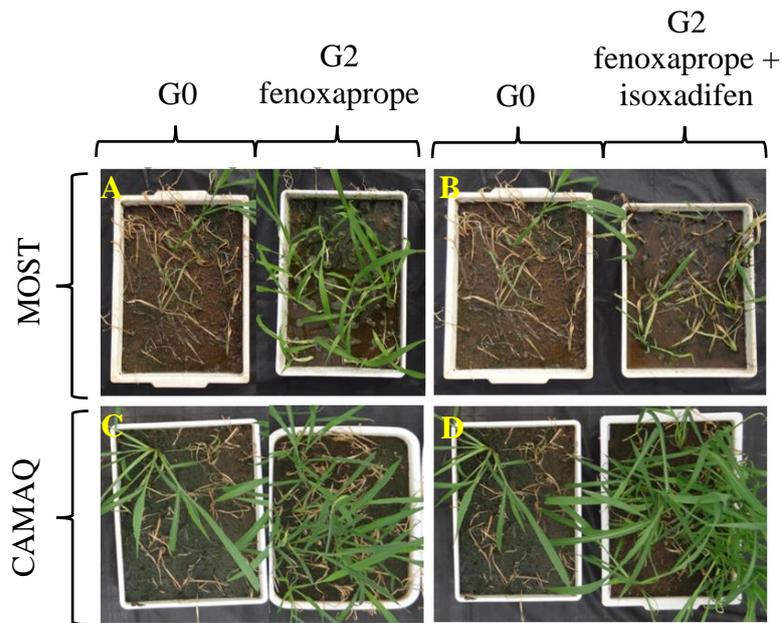


FIGURA 7. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 17,25 e 20 g ha⁻¹ de fenoxapropre para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropre; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropre + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropre; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropre + isoxadifen.

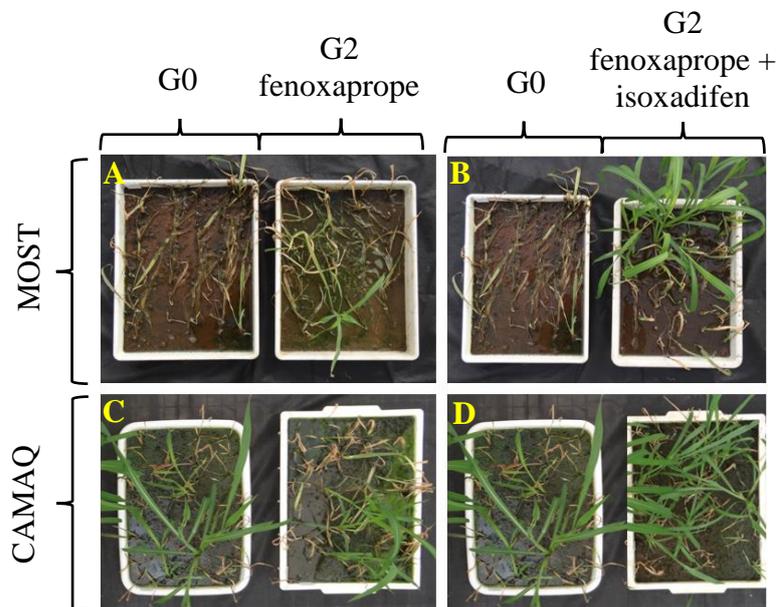


FIGURA 8. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 17,25g e 20g g ha⁻¹ de fenoxapropre + isoxadifen para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropre; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropre + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropre; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropre + isoxadifen.

Após aplicação do herbicida quincloraque observou-se que a sobrevivência das plantas das gerações G2 selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen de ambos os biótipos foram significativamente maiores em comparação com a geração G0 (Tabela 7 e 8, Figura 11). Vale salientar que a dose de quincloraque aplicada para o biótipo CAMAQ foi a recomendada (375g ha^{-1}) e, mesmo assim, a sobrevivência foi de 65,8% e 30,4% das plantas G2 selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen, respectivamente (Tabela 8).

O herbicida glifosato também apresentou menor controle nas plantas de capim-arroz selecionadas com fenoxaprope associado ao protetor isoxadifen. Após a aplicação de 370g de glifosato observou-se que a sobrevivência da G0 do biótipo MOST foi de apenas 6,2% (Tabela 7). No entanto, a sobrevivência das gerações G2 selecionadas foram maiores, com 42,2% de sobrevivência das plantas selecionadas com fenoxaprope e, de forma mais pronunciada, de 66,6% das plantas selecionadas com fenoxaprope + isoxadifen (Tabela 7). Embora a seleção de plantas através de subdoses de glifosato possa evoluir para a resistência a este herbicida, como indicado em *Lolium rigidum* (Busi e Powles, 2011), nenhum estudo até o momento identificou o potencial para a evolução da resistência ao herbicida glifosato através da seleção de plantas com subdoses de herbicidas de diferente mecanismo de ação. A seleção de *Raphanus raphanistrum* com subdoses de 2,4-D e de *Avena fatua* com subdoses de diclofope não indicam potencial para evolução da resistência cruzada ao glifosato (Ashworth *et al.*, 2016; Busi *et al.*, 2016). No presente estudo, a seleção com subdoses de fenoxaprope + isoxadifen pode ter selecionado genes codificantes de transportadores de tonoplasto envolvidos no sequestro do herbicida no vacúolo ou genes relacionados na menor translocação do herbicida como ocorre em outras espécies (Peng *et al.*, 2010; Moretti e Hanson, 2017). No entanto, estudos moleculares devem ser realizados para comprovar tal resposta, embora, outras possibilidades possam existir.

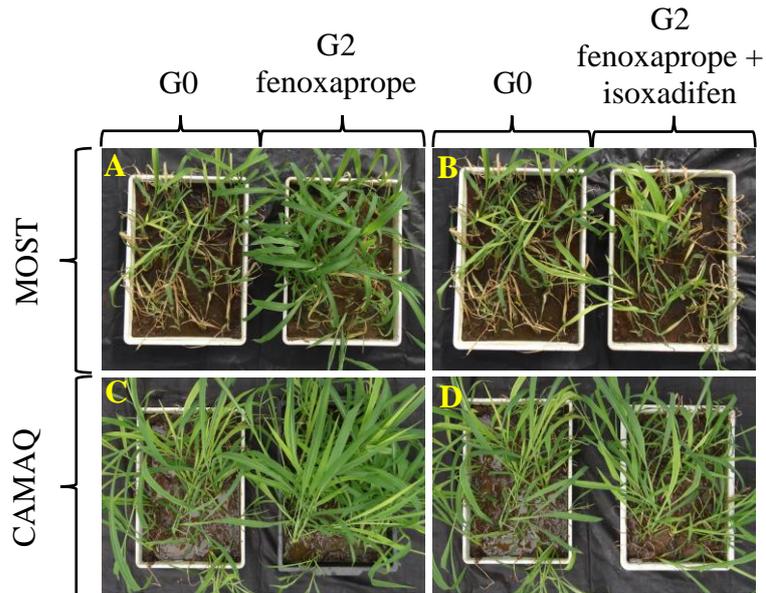


FIGURA 9. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14 DAA em relação à aplicação de 298 g ha^{-1} de diclofope para os biótipos MOST e CAMAQ. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen.

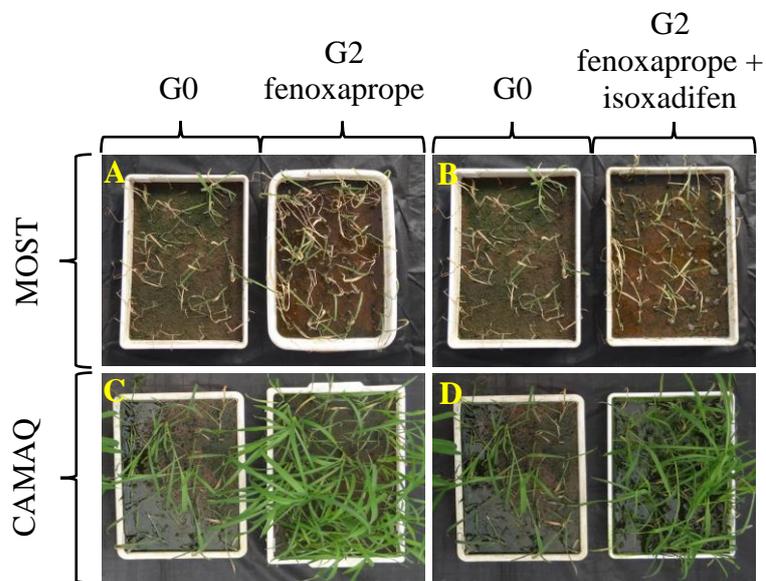


FIGURA 10. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14 DAA em relação à aplicação de 57 g ha^{-1} de cialofop para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen.

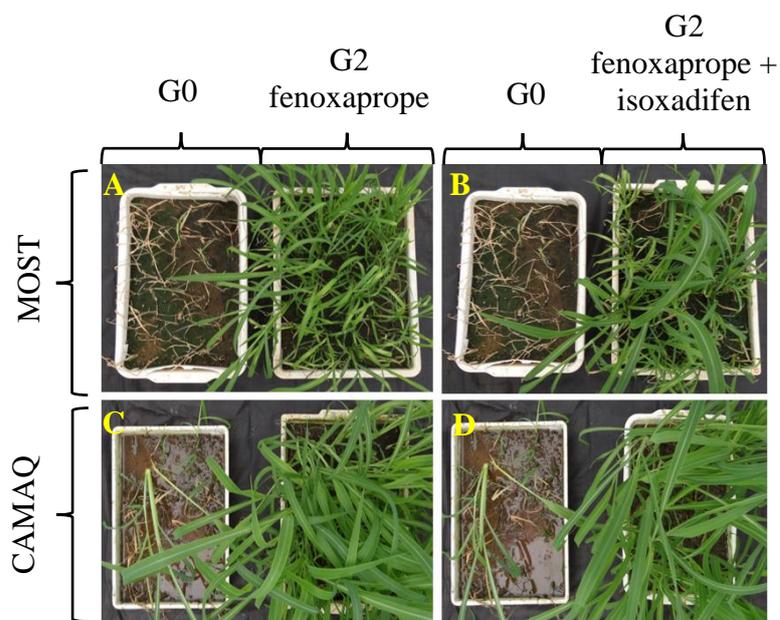


FIGURA 11. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14 DAA em relação à aplicação de 262,5g e 375 g ha⁻¹ de quinclorac para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen; (C) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen.

O herbicida paraquate apresentou maior controle nas plantas de capim-arroz de ambos os biótipos que foram selecionadas com os herbicidas (Tabela 7 e 8), efeito contrário ao observado para os demais herbicidas. A sobrevivência das plantas da geração G2 dos biótipos MOST (Tabela 7) e CAMAQ (Tabela 8) foram iguais ou menores que 1,0% após a aplicação de 75 g ha⁻¹ de paraquate e para a geração G0 de 24,0% e 12,8%, respectivamente, para MOST e CAMAQ. Resultado similar também foi encontrado após aplicação de propanil. As plantas da G2 selecionadas com fenoxaprop do biótipo CAMAQ foram mais sensíveis ao herbicida em relação a G0 (Tabela 9).

Estudos de evolução para resistência cruzada através de subdoses de herbicidas já foram relatados em outras plantas daninhas, no entanto, sem a utilização de protetor. Em *Avena fatua* a seleção a partir de subdoses com diclofope proporcionou o menor controle das plantas após a aplicação dos herbicidas inibidores da enzima ALS mesosulfuron e imazapir + imazapic (Busi *et al.*, 2016). A seleção de *Amaranthus palmeri* com subdoses de dicamba reduziram o controle tanto para o dicamba como para o herbicida 2,4-D (Tehranchian *et al.*, 2017). Em outro estudo, a seleção de plantas de *Raphanus raphanistrum* após quatro gerações de seleção usando subdoses de 2,4-D causaram aumento da tolerância ao herbicida e resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima ALS metosulam e clorsulfuron

(Ashworth *et al.*, 2016). No entanto, nenhum trabalho estudou o efeito da seleção com subdoses de herbicida formulado com protetor na evolução da resistência cruzada. Conforme os resultados obtidos, a adição de protetor na seleção de plantas de *E. crus-galli* proporcionou potencial de evolução da resistência a outros herbicidas, proporcionando menor controle para o herbicida glifosato para o biótipo MOST (Tabela 7) e ao clodinafope para o biótipo CAMAQ (Tabela 8). No restante dos resultados não houve incremento de sobrevivência das plantas selecionadas com fenoxaprope + isoxadifen. Pelo contrário, a seleção usando subdoses de fenoxaprope sem o protetor proporcionaram os menores controle quando aplicados herbicidas de outros mecanismos de ação. Isso fica evidente quando se observa os dados de sobrevivência de MOST e CAMAQ após a aplicação dos herbicidas diclofope, cialofope e quincloraque (Tabela 7 e 8).

3.3.4.1 Caracterização da evolução de resistência cruzada e múltipla por metabolização avaliada através de inibidores de enzimas P450

A partir dos resultados obtidos no experimento da caracterização do potencial para evolução da resistência cruzada ou múltipla, os herbicidas quincloraque e diclofope para as gerações do biótipo MOST e quincloraque e cialofope para as gerações do biótipo CAMAQ, foram escolhidos para realizar experimento de caracterização da evolução da resistência por metabolização através de curvas de dose-resposta utilizando inibidor de enzima P450.

3.3.4.1.1 Gerações selecionadas dos biótipos MOST e CAMAQ em resposta ao quincloraque com inibidor de P450.

A interação tripla entre os fatores gerações, inibidor e doses do herbicida foi significativa para a variável controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea para ambos os biótipos MOST e CAMAQ (Apêndice 5). Para o biótipo MOST, o controle das plantas da G2 selecionadas tanto com fenoxaprope quanto fenoxaprope + isoxadifen foi menor nas variáveis controle visual e massa fresca da parte aérea comparada com a G0 (Figura 12A e C). O valor de C_{50} e GR_{50} foi de 103,0 e 37,2 g ha⁻¹ de quincloraque para a G2 selecionada com fenoxaprope e de 50,6 e 20,7 g ha⁻¹ de quincloraque para a G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen, respectivamente (Tabela 9). As plantas selecionadas com fenoxaprope foram mais tolerantes ao quincloraque do que as plantas selecionadas com fenoxaprope + isoxadifen. A aplicação do inibidor malathion reverteu o

FR de 1,9 para 0,5 e de 1,5 para 0,6 nas plantas selecionadas com fenoxapropre, embora esse efeito também tenha ocorrido nas plantas da G0 de maneira menos expressiva (Tabela 9).

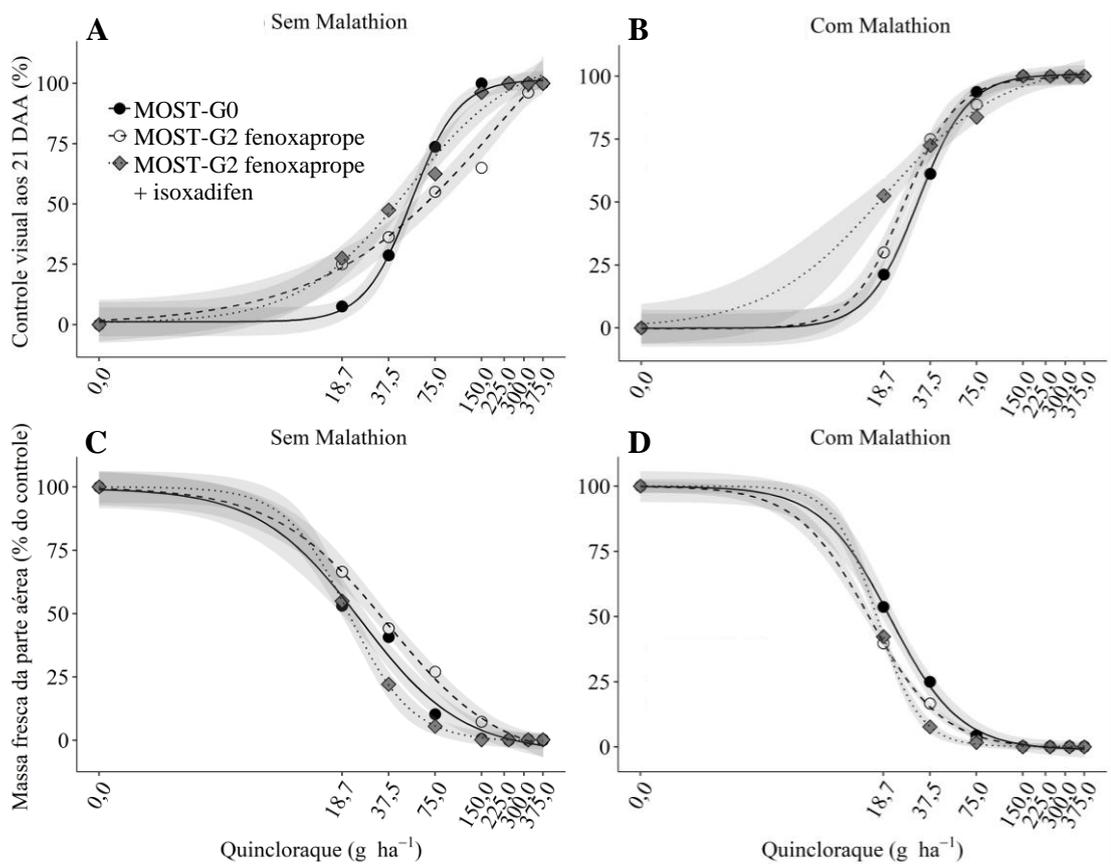


FIGURA 12. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxapropre e G2 selecionada com fenoxapropre + isoxadifen do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida quincloraque sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion.

As plantas do biótipo CAMAQ selecionadas com ambos os herbicidas foram menos controladas pelo quincloraque em relação à G0 (Figura 13). Os baixos valores de C₅₀ (27,5 g ha⁻¹) e GR₅₀ (24,2 g ha⁻¹) nas plantas da G0 indicam a suscetibilidade do biótipo ao herbicida quincloraque antes dos ciclos de seleção (Tabela 10). No entanto, a seleção deste biótipo com subdoses dos herbicidas fenoxapropre e fenoxapropre + isoxadifen proporcionou um aumento significativo na tolerância ao quincloraque. Os valores de C₅₀ e GR₅₀ foram de 186,6 e 263,0 g ha⁻¹ de quincloraque para as plantas selecionadas com apenas fenoxapropre e de 165,9 e 168,6 g ha⁻¹ de quincloraque para as plantas selecionadas com fenoxapropre + isoxadifen, respectivamente (Tabela 10). Os valores de FR em relação à variável controle visual foi de 6,9 e 5,8 para as plantas selecionadas com fenoxapropre e fenoxapropre + isoxadifen, respectivamente, demonstrando o aumento da tolerância ao quincloraque devido as seleções recorrentes com subdoses. Do mesmo modo como para o biótipo MOST, os

valores de FR das variáveis avaliadas foram maiores para a geração G2 selecionada com fenoxapropé comparada com a geração selecionada com fenoxapropé + isoxadifen, indicando que a evolução para a resistência ao herbicida quincloraque é devido ao herbicida e não ao protetor isoxadifen. A aplicação do inibidor malathion reverteu os valores dos FRs e, em maior magnitude, na geração selecionada com fenoxapropé + isoxadifen (Tabela 10). Os resultados obtidos para o biótipo MOST e CAMAQ indicam que a evolução da tolerância ao herbicida quincloraque pode estar relacionada a metabolização por enzimas P450. A metabolização de quincloraque foi maior no biótipo CAMAQ (Tabela 10). Este biótipo possui resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS associada à metabolização por enzimas P450 (Matzenbacher *et al.*, 2015), e assim, pode ser mais propenso em desenvolver resistência por metabolização aos outros herbicidas.

TABELA 9. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxapropé e G2 selecionada com subdoses de fenoxapropé + isoxadifen do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de quincloraque com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	B	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-2,8	1,2	101,7	52,8	±6,3	-
	com	-2,7	0,3	100,8	31,3	±3,9	0,6*
G2 selecionada com fenoxapropé	sem	-1,0	0,6	133,8	103,0	±5,2	1,9*
	com	-2,6	-0,3	99,6	25,5	±3,2	0,5*
G2 selecionada com fenoxapropé + isoxadifen	sem	-1,2	0,6	112,3	50,6	±14,1	0,9
	com	-1,1	0,1	105,2	18,9	±4,9	0,3*
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	1,3	-4,9	99,6	24,7	±3,9	-
	com	1,9	-1,2	99,9	20,8	±2,4	0,8*
G2 selecionada com fenoxapropé	sem	1,2	-8,7	99,9	37,2	±7,5	1,5*
	com	1,8	-0,8	100,0	15,2	±2,4	0,6*
G2 selecionada com fenoxapropé + isoxadifen	sem	2,1	-0,5	100,0	20,7	±2,2	0,8*
	com	3,1	0,1	100,0	17,0	±1,5	0,7*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas a aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com quincloraque sem aplicação prévia do inibidor. *p<0,05 pelo teste F.

A resistência por metabolização aos herbicidas é muito comum em biótipos de capim-arroz (Iwakami *et al.*, 2014b; Iwakami *et al.*, 2015). Vários casos de resistência por metabolização aos herbicidas inibidores da enzima ALS e inibidores da enzima ACCase já foram relatados e, genes da família citocromo P450 como *CYP81A12*, *CYP81A21*, *CYP81A6* e também genes do tipo *GST* foram associados com o incremento de metabolização (Iwakami *et al.*, 2014a; Dalazen *et al.*, 2018b). Recentemente, foi identificado que estes mesmos genes apresentam capacidade de metabolizar herbicidas de cinco grupos químicos diferentes, tanto herbicidas inibidores da ALS, como também inibidores da ACCase, sendo caracterizados como fortes candidatos na resistência múltipla encontradas nessa espécie (Iwakami *et al.*, 2019). Os efeitos do herbicida fenoxaprop em interação com o protetor isoxadifen encontrados no presente trabalho em relação ao aumento da sobrevivência em gerações selecionadas com estes produtos (Tabela 7 e 8) e maior tolerância a outros herbicidas como quincloraque (Tabela 9 e 10, Figura 13) podem contribuir para a explicação da ocorrência de resistência múltipla em *E. crus-galli*.

Diversos casos de resistência ao herbicida quincloraque em capim-arroz já foram relatados em vários países (Lovelace *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2010; Yasuor *et al.*, 2012; Matzenbacher *et al.*, 2015). Em alguns casos, a resistência ao herbicida quincloraque está associada com resistência aos inibidores da ALS e ACCase em capim-arroz (Eberhardt *et al.*, 2016). Embora ainda pouco conhecido, alguns trabalhos tentam elucidar o mecanismo de resistência das plantas ao quincloraque. Um dos fatores que torna o entendimento da resistência a esse herbicida dificultoso é o mecanismo de ação diferente que apresenta em gramíneas. O quincloraque juntamente com o florpiauxifen são os únicos herbicidas auxínicos com efeito em gramíneas (Bell *et al.*, 2019). Alguns estudos indicam que o quincloraque age na inibição da síntese da parede celular em gramíneas (Koo *et al.*, 1997), embora outros não verificaram tal efeito (Tresch e Grossmann, 2003). A ação de quincloraque como herbicida auxínico em gramíneas é descartada uma vez que a sintomatologia de epinastia não é verificada (Fipke e Vidal, 2016). O aumento da produção de cianeto e etileno em gramíneas é outro mecanismo proposto (Abdallah *et al.*, 2006). A ação do quincloraque em gramíneas parece ser um conjunto de mecanismos, que juntos levam a produção de cianeto e etileno causando a morte das plantas (Fipke *et al.*, 2016).

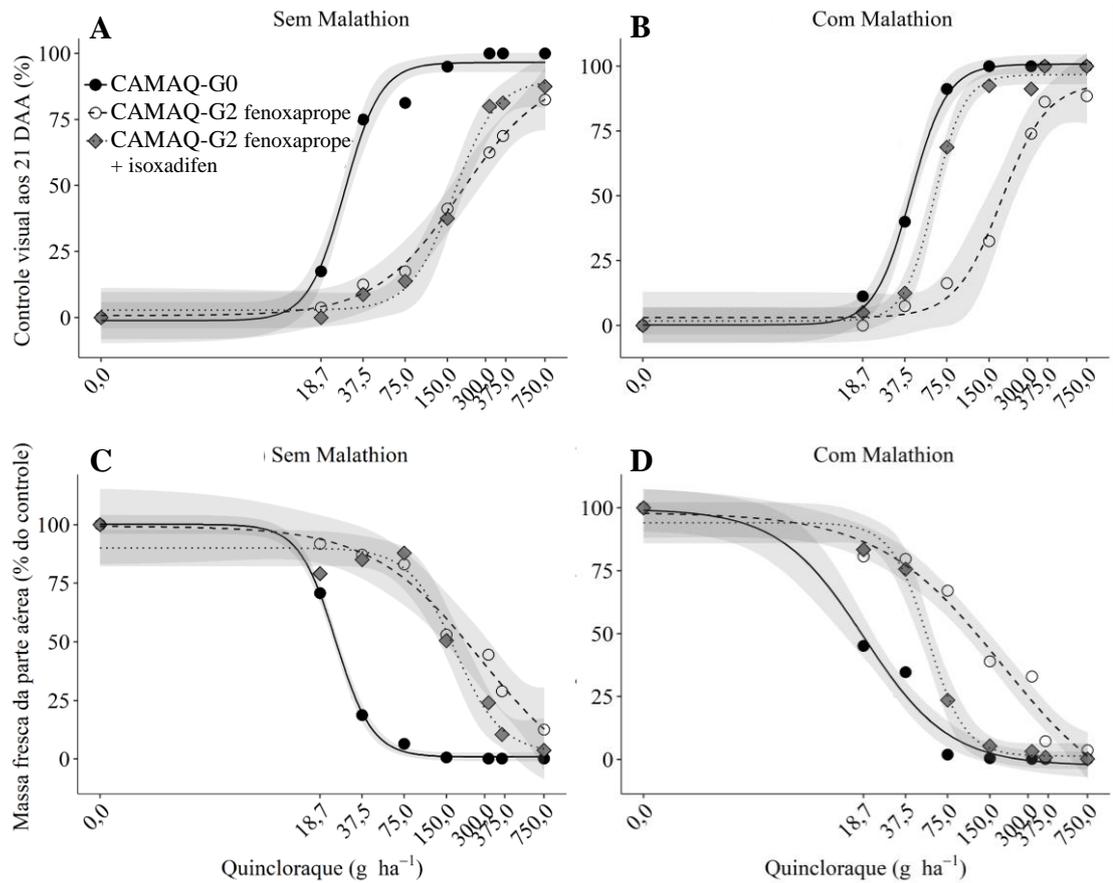


FIGURA 13. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop e G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen do biótipo CAMAQ em relação à aplicação do herbicida quinclorac sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion.

A metabolização do herbicida quinclorac já foi identificada em outros trabalhos como mecanismo de resistência após a reversão da sensibilidade ao herbicida a partir da aplicação de inibidor malathion e PBO em biótipos de capim-arroz (Matzenbacher *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2018). A maior atividade da enzima β -cianoalanina sintase (β -Cas), importante na degradação de cianeto, e também a maior expressão do gene *EcCAS*, codificante desta enzima, foram características identificadas como responsáveis pela resistência de biótipos de *E. crus-galli* var. *zelayensis* ao herbicida quinclorac (Gao *et al.*, 2017). No entanto, não se tem conhecimento se a maior expressão desse gene ocorre devido a uma mutação de ponto ou a outro fator que possa estar regulando. Embora o presente trabalho não estudou a expressão do gene e a atividade da enzima β -Cas, provavelmente a evolução da resistência nos biótipos estudados está associada à metabolização por enzimas de detoxificação como P450, GST, GT entre outras. Somado a isso, a possibilidade de que a aplicação recorrente de fenoxaprop possa estar envolvida na regulação de β -Cas não é descartada e estudos deverão ser realizados para verificar tal efeito.

TABELA 10. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope + isoxadifen do biótipo CAMAQ submetidas às diferentes doses de quincloraque com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-3,4	-1,0	96,54	27,5	±3,9	-
	com	-3,6	2,6	100,6	42,1	±5,5	1,5*
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	-1,4	0,7	93,8	186,6	±35,6	6,8*
	com	-2,7	3,0	93,6	184,0	±36,2	6,7*
G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	sem	-2,8	2,8	90,1	165,9	±30,7	6,0*
	com	-4,1	1,8	96,7	60,9	±8,2	2,2*
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	3,3	0,9	100,1	24,2	±4,1	-
	com	1,4	-2,6	99,6	18,9	±6,3	0,8
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	1,1	-13,2	99,4	263,0	±32,4	10,8*
	com	1,0	-22,3	98,2	184,3	±24,8	7,6*
G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	sem	2,7	3,2	92,1	168,6	±25,3	6,9*
	com	3,2	1,3	94,1	54,3	±9,3	2,2*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas a aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com quincloraque sem aplicação prévia do inibidor. *p<0,05 pelo teste F.

3.3.4.1.2 Gerações selecionadas do biótipo MOST em resposta ao diclofope com inibidor de P450.

A interação tripla entre os fatores gerações, inibidor e dose do herbicida não foi significativa para as variáveis controle visual aos 21DAA e massa fresca da parte aérea (Apêndice 5). Para ambas as variáveis, verificou-se interação significativa apenas entre os fatores dose e inibidor e o fator geração não apresentou diferença significativa em nenhuma combinação para ambas as variáveis analisadas (Apêndice 5). Os resultados da ANOVA demonstram que o controle das plantas da geração G0, G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen não diferiram após aplicação das doses do herbicida diclofope. Deste modo, a análise do experimento de curva de dose-resposta não apresentou evolução para a resistência cruzada a esse herbicida nesse biótipo (Figura 14).

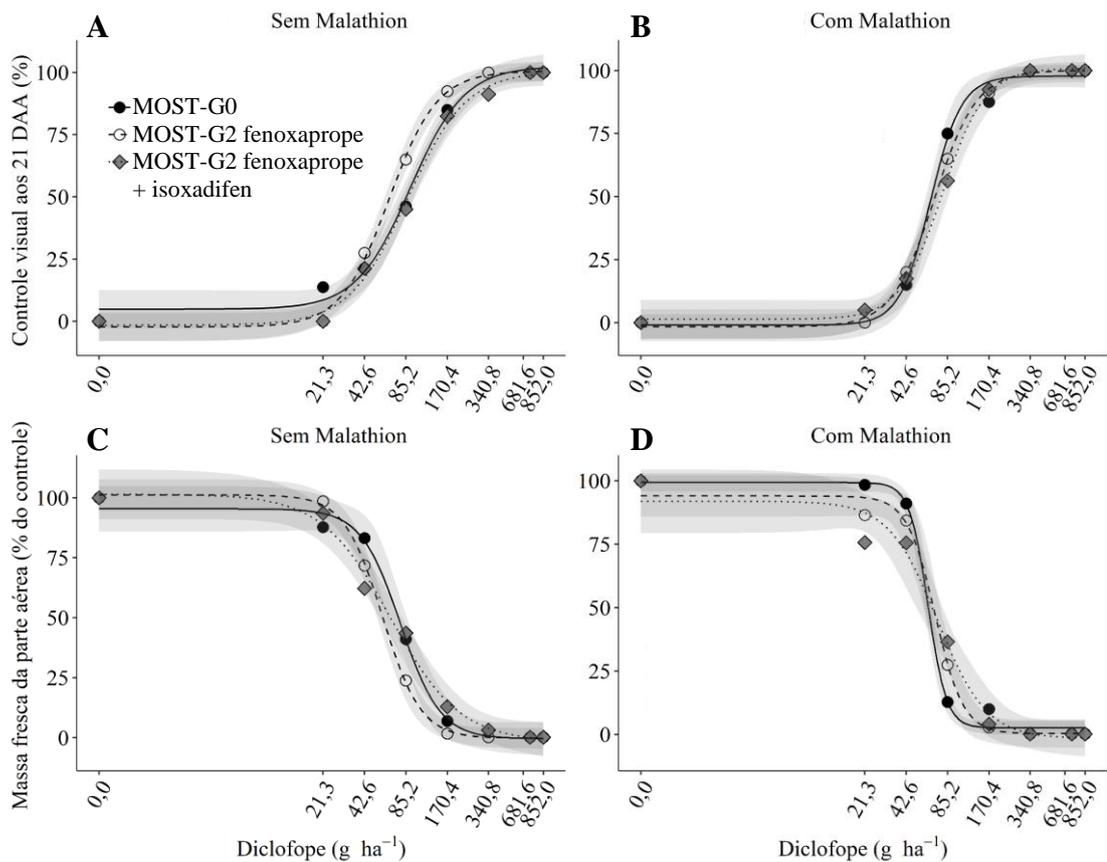


FIGURA 14. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop e G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida diclofop sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion.

O uso do inibidor malathion apresentou efeito no aumento do controle visual aos 21 DAA (Figura 14B) e na diminuição da massa fresca da parte aérea (Figura 14D) das plantas de todas as gerações estudadas após a aplicação de diclofop. Embora não tenha sido observado aumento da tolerância a este herbicida nas gerações selecionadas com fenoxaprop, o uso de malathion mostrou-se capaz de diminuir o FR para todas as gerações estudadas em comparação ao não tratamento prévio das plantas com o inibidor (Tabela 11). Os herbicidas inibidores da enzima ACCase, principalmente do grupo químico dos ariloxifenoxipropionatos, como o diclofop, são conhecidos pelo grande número de casos de resistência através da metabolização e pela evolução rápida de resistência quando este herbicida é utilizado nas seleções em subdoses (Neve e Powles, 2005a; Gaines *et al.*, 2014; Busi *et al.*, 2016). No entanto, o estudo através de curva de dose-resposta com as gerações selecionadas com subdoses de fenoxaprop com ou sem a associação do protetor isoxadifen não mostrou evolução para resistência ao diclofop. O efeito da maior tolerância ao

diclofope pelas plantas selecionadas está associado apenas na maior sobrevivência de plantas em aplicações de subdoses quando em populações maiores de plantas, como visto no experimento de sobrevivência (Tabela 7).

TABELA 11. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope + isoxadifen do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de diclofope com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-2,2	4,8	102,5	91,8	±13,6	-
	com	-3,9	-0,9	97,8	63,9	±8,2	0,7*
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	-2,5	-2,3	100,6	64,3	±13,2	0,7*
	com	-2,8	-1,6	100,0	68,3	±6,3	0,7*
G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	sem	-2,0	-1,6	100,5	87,8	±7,9	0,9
	com	-2,8	1,4	100,9	78,0	±9,2	0,8
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	3,0	-0,4	95,4	77,8	±11,5	-
	com	6,4	2,5	99,3	61,4	±8,2	0,8
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	3,1	-0,3	101,2	57,6	±14,9	0,7*
	com	4,2	0,2	94,0	69,2	±9,0	0,9
G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	sem	1,7	-1,8	101,5	66,2	±9,3	0,8
	com	2,5	-1,6	92,0	71,7	±14,2	0,9

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas à aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com diclofope sem aplicação prévia do inibidor. *p<0,05 pelo teste F.

3.3.4.1.3 Gerações selecionadas do biótipo CAMAQ em resposta ao cialofope com inibidor de P450.

A interação tripla para os fatores gerações, inibidor e doses do herbicida foi significativa para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea (Apêndice 5). Os resultados da análise da ANOVA demonstram que existe comportamento variável entre as gerações do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de doses do herbicida

cialofope, e que a utilização do inibidor malathion modificou o comportamento das variáveis.

O controle visual e a redução da massa fresca da parte aérea da geração G0 foi significativamente maior em relação a G2 selecionada com fenoxapropre e fenoxapropre + isoxadifen (Figura 15A). Além disso, o valor do FR em relação à variável controle visual foi significativamente maior para as plantas da G2 selecionadas com o fenoxapropre (3,2) em comparação às plantas da G2 selecionadas com fenoxapropre + isoxadifen (1,6) (Tabela 12), embora tenha ocorrido maior tolerância em ambas as populações selecionadas. Resultado similar também foi verificado na análise da variável massa fresca da parte aérea (Figura 15C). O uso do inibidor malathion reverteu os valores do FR da variável controle visual das plantas da G2 selecionadas com fenoxapropre de 3,2 para 0,6 e para as planta selecionadas com fenoxapropre + isoxadifen de 1,6 para 0,7 (Tabela 13).

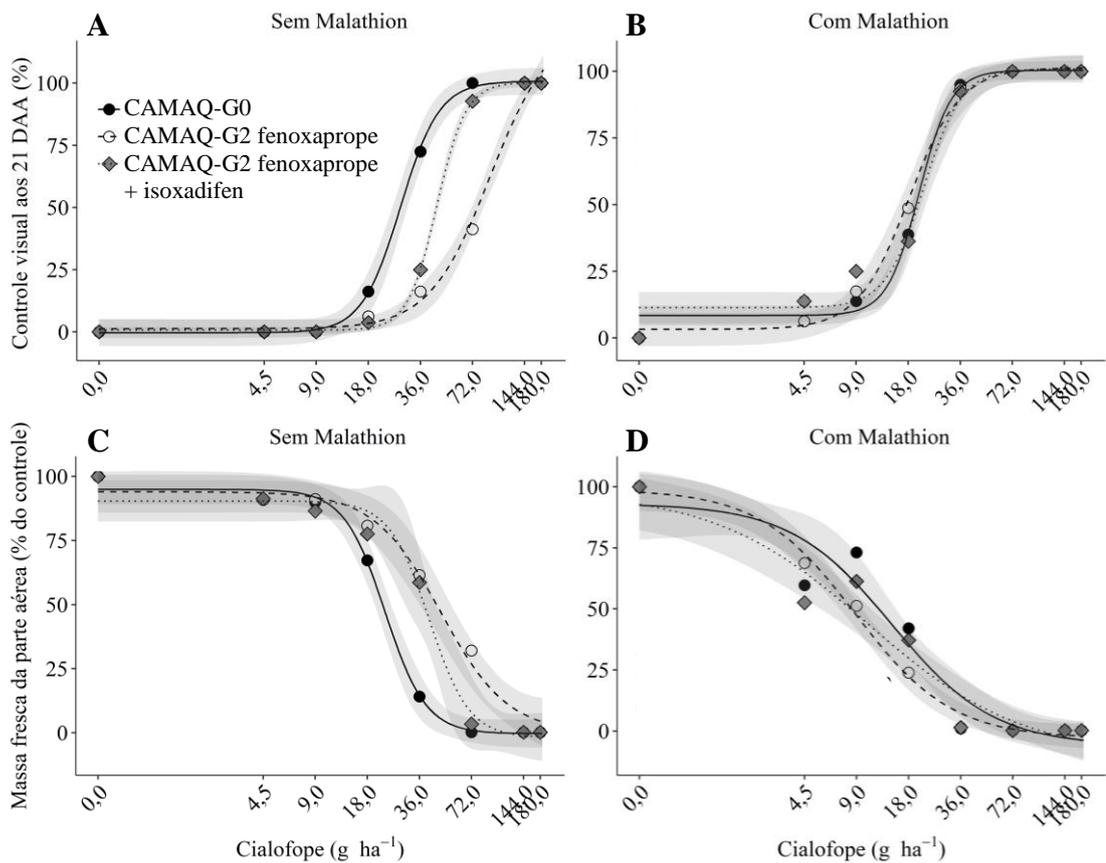


FIGURA 15. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxapropre e G2 selecionada com fenoxapropre + isoxadifen do biótipo CAMAQ em relação à aplicação do herbicida cialofope sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion.

Os resultados obtidos demonstram a existência da evolução da resistência cruzada ao herbicida cialofope para as plantas da G2 selecionadas tanto com fenoxaprope quanto com fenoxaprope + isoxadifen. No entanto, a maior tolerância ao cialofope foi verificada nas plantas da G2 selecionadas com fenoxaprope (Tabela 12). O aumento do controle das plantas da G2 selecionadas após a aplicação prévia de malathion indica que, possivelmente, a evolução para a resistência cruzada seja realizada por enzimas detoxificantes, principalmente do citocromo P450.

TABELA 12. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope + isoxadifen do biótipo CAMAQ submetidos às diferentes doses de cialofope com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-3,7	-0,4	100,9	27,9	±2,4	-
	com	-4,7	8,3	100,4	20,8	±1,6	0,7*
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	-2,4	1,3	123,0	90,6	±21,8	3,2*
	com	-3,0	3,3	101,4	18,2	±1,8	0,6*
G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	sem	-5,2	0,7	100,3	44,7	±3,9	1,6*
	com	-3,9	11,3	101,0	22,0	±1,9	0,7*
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	3,6	-1,0	95,0	22,9	±3,4	-
	com	1,6	-4,9	92,2	14,5	±5,3	0,6*
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	2,2	0,0	94,0	47,9	±11,5	2,1*
	com	1,6	-2,3	98,8	8,8	±2,3	0,4*
G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen	sem	4,1	-0,6	90,1	40,7	±5,4	1,8*
	com	1,0	-9,7	98,0	10,4	±4,3	0,4*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas à aplicação dos tratamentos/C₅₀ou GR₅₀ da geração G0 tratada com cialofope sem aplicação prévia do inibidor. *p<0,05 pelo teste F.

Devido a existência de capim-arroz resistente ao herbicida quincloraque, a tecnologia Clearfield® permitiu o uso constante de herbicidas inibidores da ALS. O uso contínuo dos herbicidas das imidazolinonas em lavouras de arroz selecionou vários biótipos de capim-arroz resistentes a este grupo químico, selecionando também biótipos com resistência múltipla a estes herbicidas (Eberhardt *et al.*, 2016; Matzenbacher *et al.*, 2015). Devido a

estes fatores, a utilização do herbicida cialofope, inibidor da enzima ACCase, aumentou, sendo atualmente um dos principais herbicidas utilizados em lavouras de arroz pela sua seletividade à cultura. Porém, os casos de biótipos de capim-arroz resistentes a este herbicida crescem anualmente (Eberhardt *et al.*, 2016; Rouse *et al.*, 2018). Na maioria dos casos, a resistência não está relacionada à mutação do gene que codifica a enzima alvo, e portanto, outros mecanismos como a metabolização do herbicida são responsáveis (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006). Os resultados do presente trabalho indicam o potencial de evolução para a resistência a esse herbicida quando ocorre a seleção de plantas com o herbicida fenoxapropo com ou sem o protetor isoxadifen e explicam o grande número de biótipos de capim-arroz identificados com resistência múltipla a estes herbicidas.

3.4 Conclusão

Plantas das gerações G2 selecionadas com subdoses de fenoxapropo apresentam maior tolerância ao herbicida em comparação com a geração G0. O protetor isoxadifen associado ao herbicida fenoxapropo proporcionou maior sobrevivência em relação às subdoses do herbicida fenoxapropo e também maior tolerância a este herbicida pelas plantas da geração G2 selecionadas. O uso de subdoses do herbicida fenoxapropo associado ou não ao protetor isoxadifen apresenta potencial para a evolução da resistência a esse herbicida.

A seleção de plantas de capim-arroz com subdoses de fenoxapropo proporciona potencial para evolução da resistência das plantas aos herbicidas clodinafop, glifosato e, principalmente, aos herbicidas cialofope e quincloraque. Este é o primeiro relato que a seleção com subdoses de fenoxapropo pode estar associada à redução do controle por esses herbicidas. O mecanismo de resistência envolvido na maior tolerância, provavelmente, é a maior capacidade de metabolização por enzimas P450.

3.5 Referências bibliográficas

ABDALLAH, I. *et al.* Mechanism of resistance to quinclorac in smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 84, n. 1, p. 38-48, 2006.

AHRENS, H. *et al.* 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors in combination with safeners: solutions for modern and sustainable agriculture. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 52, n. 36, p. 9388-9398, 2013.

- ASHWORTH, M. B. *et al.* Recurrent selection with reduced 2,4-D amine doses results in the rapid evolution of 2,4-D herbicide resistance in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 11, p. 2091-2098, 2016.
- BAGAVATHIANNAN, M. V.; NORSWORTHY, J. K. Pollen-mediated transfer of herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 9, p. 1425-1431, 2014.
- BAKKALI, Y. *et al.* Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 10, p. 4052-4058, 2007.
- BELL, J. L.; SCHMITZER, P. R.; WALSH, T. A. The molecular mode of action of auxin herbicides. In: JESCHKE, P. *et al.* (ed.). **Modern crop protection compounds**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2019. v. 1, p. 303-318.
- BUSI, R.; GIROTTO, M.; POWLES, S. B. Response to low-dose herbicide selection in self-pollinated *Avena fatua*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 3, p. 603-608, 2016.
- BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 6, n. 2, p. 231-242, 2013.
- BUSI, R.; POWLES, S. B. Reduced sensitivity to paraquat evolves under selection with low glyphosate doses in *Lolium rigidum*. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 31, n. 3, p. 525-531, 2011.
- BUSI, R.; POWLES, S. B. Inheritance of 2,4-D resistance traits in multiple herbicide-resistant *Raphanus raphanistrum* populations. **Plant Science**, Shannon, v. 257, p. 1-8, Apr. 2017.
- CHEN, G. Q. *et al.* Fenoxaprop-P-ethyl resistance conferred by cytochrome P450s and target site mutation in *Alopecurus japonicus*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 74, n. 7, p. 1694-1703, 2018.
- CUMMINS, I.; BRYANT, D. N.; EDWARDS, R. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 807-820, 2009.
- DALAZEN, G. *et al.* Degradation enhancement as the mechanism of resistance to imazethapyr in barnyardgrass. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 36, p. 1-13, 2018a.
- DALAZEN, G. MARKUS, C. MEROTTO JR, A. Differential expression of genes associated with degradation enhancement of imazethapyr in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 10, n. 9, p. 389-401, 2018b.
- DELYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forth coming decade. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2013.

- DUHOUX, A. *et al.* Herbicide safeners decrease sensitivity to herbicides inhibiting acetolactate-synthase and likely activate non-target-site-based resistance pathways in the major grass weed *Lolium sp* (rye-grass). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, [art.] 1310, p. 1-14, 2017b.
- DUHOUX, A.; CARRERE, S.; DELYE, C. Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium sp.*) plants with non-target -site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. **Plant Science**, Shannon, v. 257, p. 22-36, 2017a.
- EBERHARDT, D. S. *et al.* Barnyardgrass with multiple resistance to synthetic auxin, ALS and ACCase inhibitors. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 823-832, 2016.
- ELMORE, M. T. *et al.* Herbicide safeners increase creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) tolerance to pinoxaden and affect weed control. **Weed Technology**, Champaign, v. 30, n. 4, p. 919-928, 2016.
- ELMORE, M. T. *et al.* Influence of herbicide safeners on creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*) tolerance to herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v. 29, n. 3, p. 550-560, 2015.
- FIPKE, M. V.; VIDAL, R. A. Integrative theory of the mode of action of quinclorac: literature review. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 393-402, 2016.
- GAINES, T. A. *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **Plant Journal**, Oxford, v. 78, n. 5, p. 865-876, 2014.
- GAO, Y. *et al.* Resistance to quinclorac caused by the enhanced ability to detoxify cyanide and its molecular mechanism in *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 143, p. 231-238, 2017.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 36, n. 1, p. 24-34, 2017.
- HATZIOS, K. K.; BURGOS, N. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 454-467, 2004.
- HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. [2019]. Disponível em <<http://www.weedscience.com>> Acesso em: 10 de março de 2019.
- IWAKAMI, S. *et al.* CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. **New Phytologist**, London, v. 221, n. 4, p. 2112-2122, 2019. IWAKAMI, S. *et al.*
- Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014a.
- IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 genes induced by bispyribac- sodium treatment in a multiple- herbicide- resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 4, p. 549-558, 2014b.

IWAKAMI, S. *et al.* Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 119, p. 1-8, 2015.

JESCHKE, P. Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 3, p. 433-455, 2016.

KOO, S. J.; NEAL, J. C.; DITOMASO, J. M. Mechanism of action and selectivity of quinclorac in grass roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 57, n. 1, p. 44-53, 1997.

KRAEHMER, H. *et al.* Global distribution of rice weeds A review. **Crop Protection**, Guildford, v. 80, p. 73-86, 2016.

KREINER, J. M.; STINCHCOMBE, J. R.; WRIGHT, S. I. Population genomics of herbicide resistance: adaptation via evolutionary rescue. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.69, n. 29, p.611-635. 2018.

LOVELACE, M. L. *et al.* Quinclorac absorption and translocation characteristics in quinclorac- and propanil-resistant and -susceptible barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) biotypes. **Weed Technology**, Champaign, v. 21, n. 3, p. 683-687, 2007.

MALIK, M. S.; BURGOS, N. R.; TALBERT, R. E. Confirmation and Control of Propanil-Resistant and Quinclorac-Resistant Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Rice. **Weed Technology**, Champaign, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2010.

MARKUS, C. Epigenetic regulation - contribution to herbicide resistance in weeds? **Pest management Science**, West Sussex, v. 74, n. 2, p. 275-281, 2017.

MATZENBACHER, F. O. *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015.

MORETTI, M. L.; HANSON, B. D. Reduced translocation is involved in resistance to glyphosate and paraquat in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* from California. **Weed Research**, Champaign, v. 57, n. 1, p. 25-34, 2017.

MUNOZ, F.; VIOLLE, C.; CHEPTOU, P. O. CSR ecological strategies and plant mating systems: outcrossing increases with competitiveness but stress-tolerance is related to mixed mating. **Oikos**, Gent, v. 125, n. 9, p. 1296-1303, 2016.

NANDULA, V. K. *et al.* Herbicide metabolism: crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. **Weed Science**, Champaign, v. 67, n. 2, p. 149-175, 2019.

NEVE, P.; POWLES, S. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. **Heredity**, London, v. 95, n. 6, p. 485-492, Dec 2005a.

NEVE, P.; POWLES, S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n. 6, p. 1154-1166, Apr 2005b.

PAPORISCH, A.; RUBIN, B. Isoxadifen safening mechanism in sweet corn genotypes with differential response to P450-metabolized herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 138, p. 22-28, 2017.

PENG, Y. H. *et al.* Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 66, n. 10, p. 1053-1062, 2010.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.317-347, 2010.

R Core Team. **R version 3.3.3**: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2019. Disponível em: URL <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 4 jan. 2019.

RIECHERS, D. E.; KREUZ, K.; ZHANG, Q. Detoxification without Intoxication: Herbicide safeners activate plant defense gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 1, p. 3-13, 2010.

RITZ, C. *et al.* Dose-response analysis using R. **Plos One**, São Francisco, v. 10, n. 12, p. 13, 2015.

ROSENHAUER, M., ROSINGER, C., PETERSEN, J. Impact of the safener mefenpyr-diethyl on herbicide resistance evolution in *Alopecurus myosuroides* (Huds.) biotypes. **Julius-Kühn-Arch**, Quedlinburg, v. 452, p. 50–56. 2016.

ROSINGER, C. Herbicide safeners: an overview. **Julius-Kühn-Arch**, Quedlinburg, v. 443, p. 516–525. 2014.

ROSINGER, C; SCHULTE, W. Safeners for herbicides. *In*: JESCHKE, P. *et al.* (ed.). **Modern crop protection compounds**. 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2019. v. 1, p. 425-450.

ROUSE, C. E. *et al.* Echinochloa Resistance to Herbicides Continues to Increase in Arkansas Rice Fields. **Weed Technology**, Champaign, v. 32, n. 1, p. 34-44, 2018.

SONG, J. S. *et al.* Cross-resistance of Echinochloa species to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Weed Biology and Management**, Carlton, v. 17, n. 2, p. 91-102, 2017.

SUN, L. L. *et al.* Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. **Plos One**, São Francisco, v. 12, n. 3, p. 16, 2017.

SUN, L. L. *et al.* The expression of detoxification genes in two maize cultivars by interaction of isoxadifen-ethyl and nicosulfuron. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 129, p. 101-108, 2018.

TEHRANCHIAN, P. *et al.* Recurrent sublethal-dose selection for reduced susceptibility of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to dicamba. **Weed Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 206-212, 2017.

TRESCH, S.; GROSSMANN, K. Quinclorac does not inhibit cellulose (cell wall) biosynthesis in sensitive barnyard grass and maize roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 75, n. 3, p. 73-78, 2003.

VARANASI, V. K.; BRABHAM, C.; NORSWORTHY, J. K. Confirmation and Characterization of Non-target site Resistance to Fomesafen in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, Champaign, v. 66, n. 6, p. 702-709, 2018.

WICKHAM, H. **ggplot2: elegant Graphics for data analysis**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2016. 211p.

WRIGHT, A. A. *et al.* Characterization of Fenoxaprop-P-Ethyl-Resistant Junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaign, v. 64, n. 4, p. 588-595, 2016.

WRIGHT, A. A. *et al.* Multiple herbicide-resistant junglerice (*Echinochloa colona*): identification of genes potentially involved in resistance through differential gene expression analysis. **Weed Science**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 347-354, 2018.

YASUOR, H. *et al.* Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 1, p. 108-115, 2012.

YU, Q. *et al.* Enhanced rates of herbicide metabolism in low herbicide-dose selected resistant *Lolium rigidum*. **Plant Cell and Environment**, London, v. 36, n. 4, p. 818-827, 2013.

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1106-1118, 2014.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART, C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

YUN, M. S. *et al.* Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 83, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

ZHANG, Q. *et al.* Safeners coordinately induce the expression of multiple proteins and MRP transcripts involved in herbicide metabolism and detoxification in *Triticum tauschii* seedling tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 8, p. 1261-1278, 2007.

4 CAPÍTULO 2

**Efeito da mistura de herbicidas na evolução da resistência por metabolização em
*Echinochloa crus-galli***

EFEITO DA MISTURA DE HERBICIDAS NA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA POR METABOLIZAÇÃO EM *Echinochloa crus-galli*

RESUMO

A mistura de herbicidas é utilizada para aumentar o espectro de ação e controlar plantas daninhas resistentes a um dos componentes da mistura. No entanto, não existem informações sobre o efeito de misturas, principalmente em subdoses, na evolução da resistência aos herbicidas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de subdoses da mistura dos herbicidas fenoxaprope-p-étflico e imazetapir na evolução da resistência por metabolização em capim-arroz. Os biótipos utilizados foram MOST (suscetível ao fenoxaprope e imazetapir) e CAMAQ (resistente ao imazetapir). Inicialmente foram realizados experimentos para determinação das subdoses dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir isolados e em mistura. Posteriormente, foram realizados experimentos de seleção das plantas através das subdoses de cada herbicida isolado e da mistura. As plantas sobreviventes nas doses máximas foram multiplicadas. Dois ciclos de seleção foram realizados. Curvas de dose-resposta foram realizadas com os herbicidas fenoxaprope, imazetapir e mistura com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada com cada herbicida, para verificar aumento da tolerância. As plantas selecionadas foram avaliadas em relação ao efeito de herbicidas de outros mecanismos de ação. A seleção de capim-arroz com subdoses da mistura de fenoxaprope + imazetapir proporcionou maior sobrevivência nas progênes, principalmente do biótipo CAMAQ, em comparação com as plantas da G0. O fator de resistência (FR) para as plantas da G2 selecionadas com mistura do biótipo MOST e CAMAQ foram 1,6 e 3,1, respectivamente, em relação à G0. A seleção com subdoses do herbicida fenoxaprope isolado proporcionou diminuição de controle nas progênes de ambos os biótipos. A seleção com subdoses de imazetapir não causou diferença na sensibilidade ao herbicida. As plantas selecionadas com subdoses de fenoxaprope e com mistura de fenoxaprope + imazetapir foram mais tolerantes aos herbicidas cialofope, setoxidim, clodinafope, glifosato e, principalmente, aos herbicidas diclofope e quincloraque. O biótipo CAMAQ foi mais propenso para evolução da resistência aos herbicidas. As gerações G2 do biótipo CAMAQ selecionadas com fenoxaprope e mistura apresentaram FR de 4,8 e 3,5, respectivamente, após aplicação do quincloraque. Esses FRs foram reduzidos para 1,7 devido à aplicação do inibidor malathion. As plantas selecionadas com a mistura de fenoxaprope + imazetapir do biótipo MOST resultaram em FR de 1,7 após aplicação de diclofope. O FR foi reduzido para 0,6 em razão da aplicação do malathion. O uso da mistura de herbicidas fenoxaprope e imazetapir em subdoses pode favorecer a evolução da resistência a estes e a outros herbicidas, principalmente em plantas que apresentem resistência associada ao incremento de metabolização.

4.1 Introdução

A mistura de herbicidas é uma prática muito utilizada para aumentar o espectro de controle de plantas daninhas e reduzir custos de aplicações (Zhang *et al.*, 1995). Este manejo também é designado para mitigar a evolução da resistência aos herbicidas, principalmente a resistência relacionada ao local de ação, quando associada à utilização de herbicidas de mecanismos de ação diferentes (Beckie e Reboud, 2009; Beckie e Harker, 2017). No uso de herbicidas isolados ou em rotações anuais, a pressão de seleção é imposta apenas por um mecanismo de ação, enquanto na aplicação da mistura, a pressão de seleção imposta é múltipla e simultânea. Na pressão de seleção de dois mecanismos de ação diferentes sobrevivem apenas indivíduos raros que tenham desenvolvido resistência múltipla via mutação nos loci dos genes codificantes das enzimas alvos (Norsworthy *et al.*, 2012) ou devido à evolução simultânea de genes não associados ao local de ação. Em ambos os casos, a mitigação da resistência ocorrerá apenas quando as moléculas herbicidas da mistura tenham eficiência na espécie alvo, embora, o controle total das plantas possa não ser atingido em muitos casos (Norsworthy *et al.*, 2012).

As interações entre as moléculas decorrentes da mistura de produtos podem apresentar efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos (Zhang *et al.*, 1995; Abendroth *et al.*, 2011). Estas interações podem ocorrer durante o processo da mistura em tanques ou mesmo depois de atingir a planta (Abendroth *et al.*, 2011). A falha de controle das plantas daninhas quando do uso de mistura de herbicidas se deve muito provavelmente aos efeitos antagônicos. Alguns métodos de análises são empregados para verificar as interações das moléculas em mistura. Os métodos mais utilizados são o de Colby e o isoblograma de aditividade (Colby, 1967; Altenburger *et al.*, 1990; Sobyte *et al.*, 2011). Os herbicidas inibidores da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACCase) são frequentemente relatados apresentando antagonismo tanto nas interações resultantes da utilização dos métodos mencionados acima quanto na prática (Zhang *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2007; Matzenbacher *et al.*, 2015b). No entanto, apesar de existirem as interações antagônicas na maioria dos casos, o uso da mistura é muito comum para várias culturas, ocorrendo em aproximadamente 97% das propriedades agrícolas no Brasil (Gazziero, 2015).

A prática da mistura tem sido designada como uma das principais estratégias para evitar a resistência (Beckie e Harker, 2017). No entanto, esta recomendação é efetuada principalmente com base na evolução da resistência associada às mutações nos genes codificantes das enzimas-alvo. A recomendação da mistura de herbicidas para prevenção e

controle da ocorrência da resistência não tem sido avaliada em relação à evolução da resistência causada por metabolização.

A mistura de herbicidas é realizada, na maioria dos casos, sem nenhum acompanhamento técnico ou conhecimento prévio por parte do produtor ou, até mesmo, recomendações sobre as doses e características dos herbicidas utilizados (Gazziero, 2015; Matzenbacher *et al.*, 2015b). O controle satisfatório das plantas daninhas ocorrerá quando usada a dose recomendada de cada produto da mistura ou próximo dessa (Lagator *et al.*, 2013). No entanto, na maioria dos casos, as doses usadas de ambos os herbicidas são reduzidas para diminuir custos da aplicação ou até mesmo pelas condições ambientais de aplicações em que apenas parte do produto misturado atinge a planta alvo (Gazziero, 2015). Em alguns casos, foi verificado que a prática de redução de dose na mistura não retarda a evolução da resistência aos herbicidas (Lagator *et al.*, 2013). Pelo contrário, a mistura de herbicida com baixas doses pode até mesmo acelerar a evolução da resistência para algum componente da mistura e evoluir para resistência cruzada (Lagator *et al.*, 2013). Isto ocorre principalmente para a resistência devido ao incremento de metabolização nas progênes das plantas daninhas que sobrevivem às subdoses dos herbicidas (Neve e Powles, 2005b).

A evolução de resistência por metabolização pode ocorrer a partir da seleção de plantas daninhas através do uso de subdoses (Neve e Powles, 2005a). Em uma população de plantas daninhas suscetíveis, algumas plantas podem sobreviver às aplicações de subdoses de herbicidas em razão de possuir alelos de genes de pequeno efeito que conferem certa tolerância a pequenas doses (Ghanizadeh e Harrington, 2017b). As plantas sobreviventes têm capacidade de se cruzar e produzir sementes, contribuindo assim para aumentar a variabilidade genética e acumular alelos de genes detoxificantes em suas progênes (Busi *et al.*, 2013; Ashworth *et al.*, 2016). Estes genes são, principalmente, da família citocromo P450 monooxigenases (P450s), glutathione-S-transferases (GSTs) e glicosiltransferases (GTs) que codificam enzimas capazes de metabolizar a molécula herbicida através de processo de oxidação, conjugação com glutathione, glicose e carboidratos, tornando o herbicida não tóxico na planta (Neve e Powles, 2005a; Powles e Yu, 2010; Delye, 2013; Ghanizadeh e Harrington, 2017a; Nandula *et al.*, 2019). Essas enzimas são capazes de reconhecer e metabolizar moléculas herbicidas de diferentes grupos químicos e mecanismos de ação e até mesmo herbicidas que nunca antes foram aplicados (Yu e Powles, 2014, Iwakami *et al.*, 2019). Devido à essas características, a resistência por metabolização é um grande desafio para a agricultura e o conhecimento dos fatores que favorecem a sua evolução ainda são limitados. Além disso, o manejo da mistura de herbicidas para evitar a resistência

por metabolização pode não ser eficiente, principalmente nas situações em que está associada às baixas doses dos herbicidas.

O complexo de plantas do gênero *Echinochloa* spp. engloba várias espécies de plantas daninhas que são importantes na agricultura em nível mundial (Kraehmer *et al.*, 2016). Estas plantas infestam principalmente lavouras de arroz e apresentam vários casos de resistência aos herbicidas em vários países (Bajwa *et al.*, 2015; Matzenbacher *et al.*, 2015a; Kraehmer *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2017). Os mecanismos de resistência devido ao local de ação alterado e ao aumento da metabolização são encontrados em vários biótipos de capim-arroz (Nandula *et al.*, 2019). A rápida capacidade da evolução da resistência por metabolização dessa espécie é um grande desafio para a agricultura e poucos estudos tentam identificar os fatores que podem favorecer essa evolução. Biótipos de *E. phyllopogon* já foram identificadas com resistência cruzada aos inibidores da enzima ALS pela capacidade de metabolizar herbicidas como bensulfuron, bispiribaque-sódico e penoxsulam, através da maior expressão de genes da família P450 como *CYP8IA12* e *CYP8IA22* (Iwakami *et al.*, 2014a; Iwakami *et al.*, 2019). O gene *CYP8IA6*, caracterizado na metabolização de bentazon e metsulfuron na cultura do arroz, foi identificado como sendo gene candidato para a resistência de biótipo de *E. crus-galli* ao herbicida imazetapir (Lu *et al.*, 2015; Dalazen *et al.*, 2018b). Além disso, verificou-se biótipos de *E. crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas cialofope e penoxsulam por processos de metabolização (Iwakami *et al.*, 2015), no entanto, os fatores responsáveis não foram elucidados.

A prevenção da ocorrência da resistência e o controle de biótipos resistentes a herbicidas é preconizado principalmente pela utilização da mistura de herbicidas. A hipótese deste trabalho é que a prática da mistura utilizando subdoses dos herbicidas pode favorecer a evolução da resistência por metabolização. O efeito de um dos produtos componentes da mistura pode contribuir para a evolução da resistência por metabolização através de genes associados à tolerância ao outro produto, resultando no favorecimento da resistência a esses compostos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da seleção com o uso de subdoses da mistura dos herbicidas fenoxaprope-p-etílico e imazetapir na evolução da resistência por metabolização em *Echinochloa crus-galli*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados com os biótipos de *E. crus-galli* (capim-arroz) MOST, suscetível aos herbicidas fenoxaprope e imazetapir, e CAMAQ, caracterizado como resistente ao imazetapir em trabalhos anteriores (Matzenbacher *et al.*, 2015a). As sementes foram submetidas à quebra de dormência em ácido sulfúrico (P.A.) durante 5 minutos em cada experimento realizado. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por aproximadamente dois minutos e mantidas em temperatura ambiente para secagem durante cinco horas. A semeadura foi realizada em bandejas, preenchidas com solo (20 % de substrato de casca de arroz carbonizada + solo) e mantidas em casa de vegetação climatizada com temperatura média de $25^{\circ}\text{C} \pm 3$. As bandejas apresentavam dimensões de 35 cm (C) x 29 cm (L) x 7,5 cm (A). A irrigação ocorreu diariamente de forma a manter o solo úmido até a emergência das plantas. Seis a oito dias após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos individuais com capacidade de 200 mL preenchidos com solo, sendo considerada como uma unidade experimental para os experimentos de curvas de dose-resposta. Para experimentos de sobrevivência, as plântulas foram transplantadas para bandejas preenchidas com solo mantendo uma população de 50 a 80 plantas. A irrigação ocorreu diariamente, mantendo lâmina de água ao nível do solo.

Os herbicidas utilizados foram fenoxaprope-p-etílico (Starice®, 69g L^{-1}), designado como fenoxaprope e imazetapir (Imazetapir plus Nortox, 100g L^{-1}). A aspersão dos herbicidas foi realizada em câmara de pulverização automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), utilizando ponta de pulverização TJ8002E, pressão de 42 lb pol^{-2} e velocidade de deslocamento de $1,16\text{ m s}^{-1}$, que resultou no volume de calda de 200 L ha^{-1} . A aspersão dos herbicidas ocorreu quando as plantas de capim-arroz estavam no estágio de três a quatro folhas. Após as aplicações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada com manutenção de lâmina de água ao nível do solo.

As variáveis avaliadas nos experimentos de curvas de dose-resposta foram controle visual, massa fresca e seca da parte aérea. O controle visual (%) foi avaliado aos 21 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas por meio de escala percentual determinada através de avaliação visual, em que zero significa ausência de sintomas e 100% significa morte da planta. A massa fresca da parte aérea foi avaliada aos 21 DAA através do corte das plantas rente ao solo e mensuração em balança de precisão. O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar forçada com temperatura de 60°C até peso constante para a determinação

da massa seca. Os dados obtidos foram transformados em percentagem em relação ao controle.

A variável avaliada nos experimentos de sobrevivência foi a de plantas sobreviventes, realizada a partir da contagem de plantas tratadas e de plantas que apresentassem a emissão de pelo menos uma folha nova aos 21 DAA, consideradas como plantas sobreviventes.

4.2.2 Definição das subdoses

O primeiro trabalho realizado foi a definição das subdoses dos herbicidas fenoxaprope, imazetapir e da mistura (fenoxaprope + imazetapir) através de experimentos de curvas de dose-resposta. O trabalho foi realizado em casa de vegetação utilizando esquema fatorial 2 (biótipos) \times 9 (doses) em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O fator A foi composto pelos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ e o fator B foi constituído pelas doses de cada herbicida testado. Para o herbicida fenoxaprope as doses utilizadas foram 1,7; 3,4; 6,9; 13,8; 27,6; 55,2; 110,4 e 220,8 g ha⁻¹. As doses do herbicida imazetapir aplicadas foram 10, 20, 40, 60, 80, 160, 320 e 640 g ha⁻¹. O método de isoblograma foi utilizado para definir as melhores proporções das doses de cada herbicida para a mistura de fenoxaprope + imazetapir (Sobye *et al.*, 2011). Para tanto, foram realizadas três curvas de dose-resposta com diferentes proporções em relação às curvas de dose-resposta isoladas de cada herbicida. A primeira curva de dose-resposta para a mistura foi constituída da proporção de 75% de fenoxaprope e 25% para imazetapir em cada dose, sendo as doses de 1,3 + 2,5; 2,5 + 5; 5,2 + 10, 10,35 + 15, 20,7 + 20; 41,4 + 40, 82,8 + 80 e 165,5 + 160 g ha⁻¹, respectivamente. A segunda curva de dose-resposta para a mistura foi realizada utilizando a proporção de 50% de fenoxaprope e 50% para imazetapir com as doses 0,8 + 5; 1,7 + 10, 3,45 + 20; 6,9 + 30, 13,8 + 40, 27,6 + 80, 55,2 + 160 e 110,4 + 320 g ha⁻¹ e na terceira curva de dose-resposta foi utilizada proporção de 25% para fenoxaprope e 75% para imazetapir com as doses 0,4 + 7,5; 0,8 + 15; 1,7 + 30; 3,45 + 45; 6,9 + 60; 13,8 + 120; 27,6 + 240 e 55,2 + 480 g ha⁻¹, respectivamente.

4.2.3 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz

4.2.3.1 Material vegetal e extração de RNA

A coleta de aproximadamente 100 mg de folhas foi realizada no estádio de três a quatro folhas das plantas dos biótipos MOST e CAMAQ em microtubos de 1,5mL e acondicionados diretamente em nitrogênio líquido (NL₂). Após a coleta, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer em temperatura -80°C até a extração de RNA. Cada amostra foi composta por 100 mg de folha de uma planta individual. Três amostras de cada biótipo foram coletadas para a extração de RNA.

A extração de RNA foi realizada a partir do protocolo usando Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). A maceração das amostras ocorreu com aproximadamente 100 mg de material vegetal em NL₂, seguido da adição de 500 µl de Concert. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente um minuto até todo o material vegetal estar completamente suspenso. O material foi incubado em temperatura ambiente pelo período de cinco minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas em temperatura de 4°C durante dois minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1,5 mL livre de RNase. Em cada tubo foi adicionado 100 µl de 5M NaCl, misturado e, seguido da adição de 300 µl de clorofórmio. As amostras foram submetidas a nova centrifugação a uma temperatura de 4°C durante 10 minutos a 12000 rpm para separação das fases. A parte superior aquosa foi transferida para novo tubo de 1,5 mL livre de RNase. Em cada amostra foi adicionado o mesmo volume transferido de álcool isopropílico e deixado repousar por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este período, nova centrifugação das amostras foi realizada durante 10 minutos em temperatura de 4°C a 12000 rpm. Nesta fase já era possível visualizar a formação do *pellet* e o sobrenadante foi descartado. Após, 1 mL de etanol 75% foi adicionado ao *pellet* para sua lavagem. Nova centrifugação foi realizada durante dois minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e com auxílio de uma pipeta todo o líquido do tubo foi retirado, permanecendo apenas o *pellet*. O *pellet* de RNA foi dissolvido pela adição de 40 µl de água livre de RNase e transferido para tubos com volume de 0,6 mL. A quantificação de RNA extraído foi realizada através de espectrofotômetro (Genesys 2, Thermo Spectronic). Após a quantificação as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a utilização para purificação e síntese de cDNA.

4.2.3.2 Purificação de RNA e síntese de cDNA

As amostras de RNA foram purificadas com enzima DNase I. Em tubos de 0,2 mL 1 µg de RNA total de amostra foi adicionado juntamente com 1 µl de 10X DNase I *Reaction Buffer* e 1 µl da enzima DNase I e completado com água livre de RNase até o volume de 10 µl. Os tubos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente. Imediatamente após, 1 µl de EDTA 25 mM foi adicionado e as amostras foram incubadas em termociclador por 10 minutos a temperatura de 65°C. As amostras foram armazenadas em gelo e estavam prontas para a síntese de cDNA.

A síntese de cDNA ocorreu utilizando protocolo da enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT). Nos tubos de 0,2 mL contendo o RNA purificado (11 µl) foi adicionado 1 µl de Mix-primers-oligo(dT) 50uM, 1 µl de 10mM dNTP Mix e 0,5 µl de água livre de RNase, totalizando volume de 13,5 µl. As amostras foram incubadas por cinco minutos em termociclador à temperatura de 65°C. Após o período de incubação foi adicionado 4 µl de 5X First-Strand Buffer e 2 µl de DTT 0,1M e incubadas novamente por 37°C em termociclador por dois minutos. Após este procedimento, 0,5 µl de MMLV-RT (200U/µl) foi adicionado em cada amostra, pipetando *up and down*. As amostras foram incubadas em termociclador por 50 minutos à 37°C, seguido de um aquecimento a 70°C durante 15 minutos para a inativação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer à -20°C até o uso para a amplificação do gene *ALS*.

4.2.3.3 Desenho de primers para amplificação do gene ALS

Sequências nucleotídicas dos genes *ALS1*, *ALS2* e *ALS3* da espécie *Echinochloa crus-galli* disponibilizadas no GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com os números de acesso de LC006058.1, LC006059.1 e LC006061.1, respectivamente, e de *Arabidopsis thaliana* (NM_114714.2) foram utilizadas para o alinhamento. O alinhamento foi executado com o comando *CrustalW* do *software* de biologia molecular Bioedit versão 7.0.5. Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer 3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) adicionando a linha consenso do alinhamento obtido. O desenho dos primers foi realizado escolhendo as melhores combinações com tamanho de fragmento entre 250-500 pb, com *primers* de tamanho de 20 pb e com temperatura de pareamento de 60°C. Os *primers* foram desenhados buscando amplificar as oito posições do DNA codificante do gene *ALS* onde ocorrerem mutações relacionadas à resistência aos

herbicidas inibidores dessa enzima. Os primers desenhados foram sintetizados pela empresa Invitrogen (Carlsbad, California) (Tabela 1). Esquema do gene *ALS* com suas regiões de domínios e a localização dos *primers* estão demonstrados na Figura 1.

TABELA 1. Descrição dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *ALS* dos biótipos de capim-arroz e seus respectivos tamanho de fragmento esperado e região de domínio.

Primer	Sequência 5' para 3'	GC (%) ¹	Fragmento (pb) ²	Tm (°C) ³	Região de domínio
EcALS_1_F	GGACAGATTCTACAAGGCCAAC	50,0	286	60	E
EcALS_1_R	ATACACGGTCCTGCCATCAC	55,0			
EcALS_2_F	CATCATTGCCACTGGTGTTG	50,0	423	60	B
EcALS_2_R	TCGCTCTTCTTTGTCACACG	50,0			
EcALS_3_F	ATCCAGCTGAGATTGGCAAG	50,0	356	60	-
EcALS_3_R	AAATCCCATAGCCCCAAGAC	50,0			
EcALS_4_F	GAGTCTGCCGGGGTACATT	57,8	415	60	F
EcALS_4_R	CACATGTGGCTGCTTGTCT	50,0			
EcALS_5_F	GTCATCGCCAACCACCTC	61,1	475	60	AD
EcALS_5_R	CACCTGCTCAAGCAATTCAG	50,0			
EcALS_6_F	CGACGTCTTCGCCTACCC	66,7	336	60	CAD
EcALS_6_R	CGAGGTAGTTGTGCTTGGTG	55,0			

¹percentagem de guanina e citosina; ² pares de bases; ³ temperaturas de anelamento; F – *primer forward*; R – *primer reverse*.

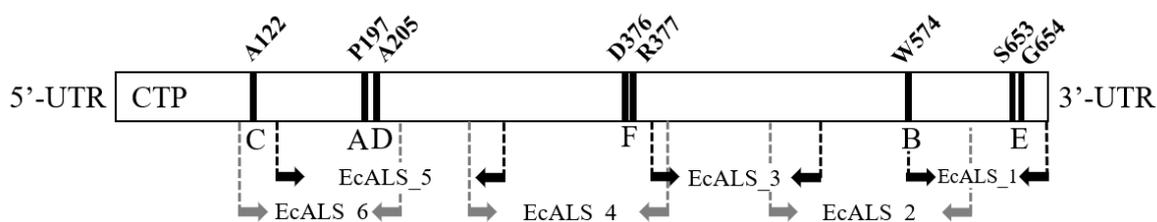


FIGURA 1. Representação esquemática do gene *ALS* de capim-arroz com as regiões de domínio (C, A, D, F, B e E) e os respectivos *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos. Faixas pretas indicam as oito posições conhecidas por ocasionar resistência aos herbicidas inibidores da ALS pela substituição de aminoácidos.

4.2.3.5 Amplificação do gene ALS

As amplificações das regiões do gene *ALS* foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf) utilizando 50 ng de cDNA, 0,5 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,2mM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,5 U de Platinum™ Taq DNA polimerase (Thermo Fisher), 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 1X PCR buffer e água

MiliQ para completar volume total de 15 μ l. Para a amplificação da região frontal do gene *ALS* foram utilizados os *primers* EcALS_4, EcALS_5 e EcALS_6, como essa região apresenta alta concentração de CG, foi adicionado nas reações 1X PCR *Enhancer* (Thermo Fisher).

O protocolo da reação de PCR foi composta por cinco minutos de desnaturação das cadeias de DNA a 95°C, seguido de 35 ciclos de um minuto a 94°C, 30 segundos a 60°C para ocorrer o pareamento, 90 segundos a 72°C para ocorrer a extensão da fita complementar do DNA e, 10 minutos a 72°C para finalização. Para os primers EcALS_4, EcALS_5 e EcALS_6 utilizou-se o protocolo *touchdown* PCR (Korbie e Mattick, 2008), composto por três minutos a 95°C para a desnaturação do DNA, seguido de duas partes de reação. A primeira parte foi de 15 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação, seguido de 45 segundos de pareamento utilizando a temperatura inicial de 69°C, diminuindo 1°C por ciclo, seguido de 1 minuto de alongamento a 72°C. A segunda parte da reação foi de 25 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação a 95°C, pareamento em 45 segundos a 50°C, seguido de alongamento em um minuto a 72°C e finalizando a reação por cinco minutos a 72°C.

Após a reação de PCR, os produtos PCR foram analisados em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio na proporção de 0,02 μ L mL⁻¹, por 60 minutos a 110 V, em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Para a análise dos tamanhos esperados, foi utilizado marcadores *Ladder* de 100 pb para comparação. Os géis foram fotografados com auxílio do programa L-PIX IMAGE Release 2.6 (Loccus Biotecnologia).

4.2.3.6 Purificação, sequenciamento e análises das regiões do gene ALS

Todas as reações realizadas apresentaram banda única esperada e a purificação ocorreu diretamente com o produto PCR. Para isto, 5 μ l de do produto PCR foi utilizado para a purificação em microtubos de 0,2 mL, adicionando 1 μ l da enzima exonuclease I (EXO) e 1 μ l da enzima fosfatase alcalina (SAP). As amostras foram incubadas a 37°C por 45 minutos, seguido de inativação da enzima pelo aquecimento a 80°C por 15 minutos. Após a purificação, em microtubos de 0,2 mL foi adicionado volume do produto PCR purificado para obter quantidade de 100 a 150 ng de DNA, 1 μ l do primer *forward* e volume de água ultrapura para completar volume de 7,5 μ l para sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi realizado através do equipamento ABI 3730 (Applied Biosystems), utilizando kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, no laboratório da empresa MYLUS Facility (Belo Horizonte, MG, Brasil). As sequências

obtidas foram analisadas utilizando o software bioedit, realizando alinhamento com o comando *CrustalW* com as sequências conhecidas do gene *ALS* de *Arabidopsis thaliana* (X51514), *ALS1*, *ALS2* e *ALS3* de *Echinochloa crus-galli* (LC006058.1, LC006059.1 e LC006061.1, respectivamente) e observando a ocorrência de mutações nas oito posições do gene *ALS* relacionadas com a resistência aos herbicidas naturalmente. Outras mutações no gene *ALS* causadas artificialmente que resultaram em resistência aos herbicidas inibidores da enzima *ALS* que, no entanto, ainda não encontrados naturalmente (Tranel e Wright, 2002), também foram verificadas.

4.2.4 Avaliação do mecanismo de resistência através de inibidores de metabolização

O experimento foi realizado para determinar a capacidade de metabolização do herbicida imazetapir pelos biótipos através da aplicação prévia de inibidores. O experimento de curva de dose-resposta foi realizado em esquema fatorial 3×9 para cada biótipo, utilizando delineamento inteiramente casualizado. Os fatores foram compostos pelo uso de inibidores (fator A) e doses de herbicidas (Fator B). O fator A foi composto pelos tratamentos sem a aplicação de inibidor, com a aplicação do inibidor de P450 malathion e butóxido de piperonila (PBO) nas doses de 1000 e 1200 g ha⁻¹, respectivamente. A aspersão dos inibidores foi realizada duas horas antes para aplicação do herbicida. As doses de imazetapir utilizadas foram 0; 1; 2,5; 5, 10; 20; 40; 80 e 100 g ha⁻¹ para o biótipo MOST e 0; 10; 20; 40; 60; 80; 160; 340 e 680 g ha⁻¹ para o biótipo CAMAQ.

4.2.5 Seleção das gerações e análise da sobrevivência da G0, G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ

Este estudo foi conduzido por meio de aplicações recorrentes de subdoses dos herbicidas, que foram escolhidas a partir do estudo de curvas de dose-resposta descrito anteriormente no item 4.2.2. As populações iniciais de capim-arroz do biótipo MOST (MOST-G0) e CAMAQ (CAMAQ-G0) foram utilizadas para o estudo de sobrevivência na geração G0 para cada herbicida (fenoxaprope, imazetapir e fenoxaprope + imazetapir) e para a seleção de plantas para obter a geração G1, utilizando três subdoses. As doses utilizadas para o biótipo MOST na geração G0 foram de 13,8; 17,25 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprope, 2, 4 e 8 g ha⁻¹ de imazetapir e de 0,8 + 5; 1,7 + 10 e 3,4 + 20 g ha⁻¹ para a mistura de fenoxaprope + imazetapir. Plantas sobreviventes da dose 17,25; 8,0 e 3,45+20,0 g ha⁻¹ de fenoxaprope, imazetapir e fenoxaprope + imazetapir, respectivamente, foram selecionadas para a obtenção

de sementes das gerações G1 do biótipo MOST. Para o biótipo CAMAQ na geração G0 as doses utilizadas foram 6,9; 13,8 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprope, 80,160 e 320 g ha⁻¹ de imazetapir e 3,45 + 20; 6,9 + 30 e 10,3 + 35 g ha⁻¹ para a mistura fenoxaprope + imazetapir, respectivamente. Plantas sobreviventes das doses 13,8; 320 e 10,35 + 35 g ha⁻¹ de fenoxaprope, imazetapir e fenoxaprope + imazetapir, respectivamente, foram selecionadas para obtenção da G1 do biótipo CAMAQ.

As plantas da geração G1 foram submetidas a nova aplicação de três subdoses dos herbicidas para a obtenção da geração G2. A dose em que as plantas da geração G1 foram selecionadas e duas doses maiores foram escolhidas para esta nova aplicação. Para o biótipo MOST as doses aplicadas foram de 17,25; 20,7 e 24,15 g ha⁻¹ de fenoxaprope na G1 selecionada com fenoxaprope, 8, 10 e 15 g ha⁻¹ de imazetapir na G1 selecionada com imazetapir e 3,45 + 20; 5,2 + 25 e 6,9 + 30 g ha⁻¹ da mistura de fenoxaprope + imazetapir na G1 selecionada com a mistura. Para o biótipo CAMAQ, as doses aplicadas foram de 13,8; 20,7 e 27,6 g ha⁻¹ de fenoxaprope na G1 selecionada com fenoxaprope, 320, 480 e 640 g ha⁻¹ de imazetapir na G1 selecionada com imazetapir e de 10,35 + 35; 20,7 + 60 e 27,6 + 80 g ha⁻¹ da mistura de fenoxaprope e imazetapir sobre plantas da G1 selecionadas com a mistura. As plantas sobreviventes do biótipo MOST nas doses 17,25; 15 e 6,9 + 30 g ha⁻¹ e do biótipo CAMAQ nas doses 20,7, 640 e 27,6 + 80 g ha⁻¹ de fenoxaprope, imazetapir e fenoxaprope + imazetapir, respectivamente, foram selecionadas para obtenção de sementes da geração G2.

De maneira similar, as plantas da G2 foram submetidas a nova aplicação de subdoses apenas para avaliação de sobrevivência nessa geração. Para o biótipo MOST as doses aplicadas foram 13,8; 17,25 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprope na G2 selecionada com fenoxaprope; 15, 25 e 35 g ha⁻¹ de imazetapir na G2 selecionada com imazetapir e 6,9 + 30, 13,8 + 40 e 20,7 + 60 g ha⁻¹ da mistura de fenoxaprope + imazetapir na G2 selecionada com a mistura. Para o biótipo CAMAQ as doses aplicadas foram 13,8; 20,7 e 27,6 g ha⁻¹ de fenoxaprope na G2 selecionada com fenoxaprope, 640, 1060 e 1280 g ha⁻¹ de imazetapir na G2 selecionada com imazetapir e 27,6 + 80, 34,5 + 100 e 41,4 + 120 g ha⁻¹ da mistura de fenoxaprope e imazetapir sobre plantas da G2 selecionadas com a mistura. Em cada ciclo de seleção, uma população de 40 a 50 plantas de cada biótipo foi utilizada como controle sem seleção (sem aplicação de herbicida). Destas plantas, 20 foram escolhidas aleatoriamente para obter as próximas gerações G1 e G2 controle (sem seleção).

A aplicação de cada herbicida foi realizada em uma população média de 186 plantas, distribuídas em três bandejas preenchidas com solo. As plantas selecionadas em cada geração foram transplantadas para vasos com capacidade de 500 mL preenchidos com solo

e mantidas em casa de vegetação para a produção de sementes. Antes do florescimento, as plantas foram isoladas com auxílio de estruturas de tecido, para evitar a entrada de pólen externo. No estágio de maturidade, todas as sementes foram coletadas, secadas em estufa de circulação de ar forçado a 40°C por sete dias e, posteriormente, armazenadas em temperatura de 20°C. Esquema representativo dos ciclos de seleções está disposto na Figura 2.

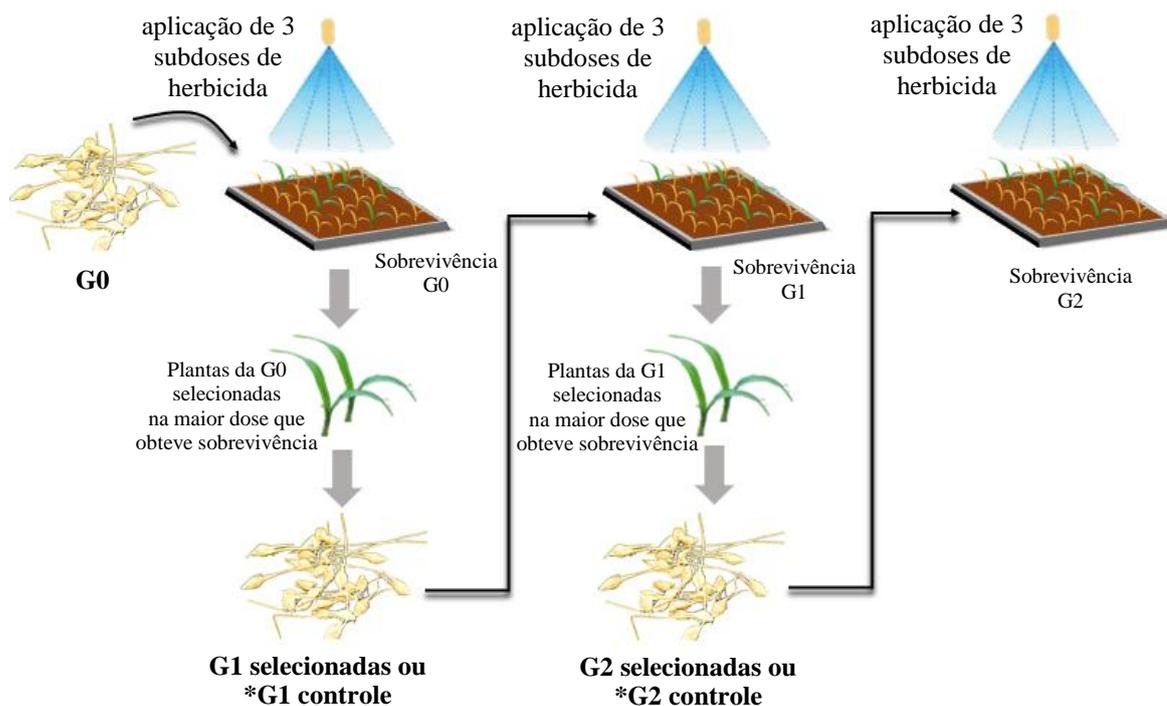


FIGURA 2. Esquema representativo dos ciclos de aplicações de subdoses de cada herbicida, avaliações da sobrevivência e seleção de plantas sobreviventes para composição das gerações G1 e G2 dos biótipos MOST e CAMAQ. *Para obtenção das gerações controles (G1 e G2 controle) não foi realizada a aplicação de herbicidas.

4.2.6 Curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionada

Plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ das gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas com os herbicidas fenoxapropir, imazetapir e fenoxapropir + imazetapir foram submetidas ao experimento de curvas de dose-resposta com cada herbicida que foram utilizados nas seleções das gerações para a verificação do aumento da tolerância entre as gerações. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3×8 , com 4 repetições. O fator A foi composto pelas gerações de seleção G0, G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada com fenoxapropir ou imazetapir ou fenoxapropir + imazetapir para cada biótipo (MOST ou CAMAQ). O fator B foi constituído pelas doses

0; 1,7; 3,4; 6,9; 13,8; 27,6; 55,2; 110,4 e 220,8 g ha⁻¹ de fenoxapropé usada para G2 selecionada com fenoxapropé, 0; 2; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 100 g ha⁻¹ de imazetapir para a G2 selecionada com imazetapir e de 0; 0,8+5; 1,7+10; 3,45+20; 6,9+30; 13,8+40; 27,6+80; 55,2+160 e 110+320 g ha⁻¹ de fenoxapropé + imazetapir, respectivamente, para a G2 selecionada com a mistura. As variáveis avaliadas foram controle visual aos 21 DAA; massa fresca e seca da parte aérea.

4.2.7 Caracterização da evolução da resistência a outros herbicidas

A caracterização da evolução da resistência cruzada e múltipla foi realizada para os herbicidas inibidores da enzima ACCase (fenoxapropé-p-etílico, diclofopé-metílico, clodinafopé-propargil, cialofopé, setoxidim), inibidores da enzima ALS (imazetapir, penoxsulam), mistura (fenoxapropé + imazetapir), inibidor da enzima EPSPS (glifosato), mimetizador de auxina (quincloraque), inibidor do FSI (paraquate) e FSII (propanil). As gerações G0 e G2 selecionadas com fenoxapropé, imazetapir e mistura foram tratadas com estes herbicidas no estágio de três a quatro folhas, nas doses descritas na Tabela 2. As doses dos herbicidas foram escolhidas através de experimentos preliminares através da aplicação de 25, 50 e 75% da dose recomendada dos herbicidas em quatro plantas de ambos os biótipos (dados não apresentados). Cada herbicida foi aplicado em uma população média de 49 plantas de cada geração, distribuídas em bandejas preenchidas com solo. O número de plantas de capim-arroz presentes em cada bandeja foi mensurado antes da aplicação dos herbicidas e o número de plantas sobreviventes foi mensurado aos 21 DAA.

TABELA 2. Herbicidas aplicados em plantas de capim-arroz das gerações G0 e G2 selecionada com fenoxaprope, imazetapir e fenoxaprope + imazetapir dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ, para a caracterização da evolução da resistência cruzada ou múltipla.

Herbicida	Produto comercial	Mecanismo de ação	Dose recomendada (g ha ⁻¹)	Adjuvante (0,5% v/v)	Dose aplicada (g ha ⁻¹)	
					MOST	CAMAQ
Fenoxaprope-p-etílico	Starice®	Inib. ACCase	69	Aureo	17,25	20
Diclofope-metílico	Iloxan CE	Inib. ACCase	852	Veget'Oil (2 L ha ⁻¹)	298	298
Clodinafope-propargil	Topik® 240 EC	Inib. ACCase	24	Assist	18	9
Cialofope-butílico	Clincher®	Inib. ACCase	228	Veget'Oil (2 L ha ⁻¹)	57	57
Setoxidim	Poast®	Inib. ACCase	184	Assist	92	92
Imazetapir	Imazetapir Plus Nortox	Inib. ALS	100	Dash	30	200
Penoxsulam	Ricer®	Inib. ALS	48	Veget'Oil	48	48
Fenoxaprope + Imazetapir	Starice® + Imazetapir Plus Nortox	Inib. ACCase + Inib. ALS	69 + 100	Dash	6,9 + 15	34,5 + 55
Quincloraque	Facet®	Mim. auxina*	375	Assist	262,5	375
Glifosato	Roundup Original Di	Inib. EPSPS	740	-	370	185
Paraquate	Gramoxone® 200	Inib. FSI	300	-	75	75
Propanil	Stam 800 WG	Inib. FSII	3600	-	3600	3600

* mecanismo de inibição de parede celular em gramíneas. Inib. ACCase – inibidor da enzima Acetil CoA Carboxilase; Inib. ALS – Inibidor da enzima Acetolactato Sintase; Mim. auxina – mimetizador de auxina; Inib. EPSPS – inibidor da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato-sintase; Inib. FSI e FSII – inibidor do fotossistema I e II, respectivamente.

4.2.7.1 Caracterização da evolução da resistência cruzada e múltipla por metabolização através de inibidor de P450

Os tratamentos herbicidas que apresentaram diferença significativa no teste qui-quadrado (χ^2) entre as gerações G0 e G2 selecionadas foram escolhidos para realizar experimento de curva de dose-resposta com ou sem a aplicação do inibidor de P450 malathion. Os herbicidas escolhidos foram o quincloraque e diclofope para ambos os biótipos MOST e CAMAQ. Os experimentos foram realizados em esquema trifatorial (4 × 2 × 8) em delineamento inteiramente casualizado. O fator A foi composto pelas gerações de seleção G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com fenoxaprope + imazetapir. O fator B foi constituído pela aplicação ou não

do inibidor malathion e o fator C por oito doses de cada herbicida. Para o herbicida quincloraque foram utilizadas as doses de 0; 18,75; 37,5; 75; 150; 225 (apenas para MOST); 300; 375 e 750 g ha⁻¹ (apenas para CAMAQ). As doses de diclofope foram 0; 21,3; 42,6; 85,2; 170,4; 340,8; 681,6; 852 g ha⁻¹. A aplicação do inibidor malathion na dose de 1000g ha⁻¹ realizou-se duas horas antes da aplicação das doses dos herbicidas, de mesma forma como a aspersão dos herbicidas. As variáveis avaliadas foram controle visual e massa fresca da parte aérea.

4.2.9 Análise dos dados

O *software* estatístico R v.3.5.3 foi utilizado para a análise dos dados (R Core Team, 2019). Os dados obtidos dos experimentos de curvas de dose-resposta foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e à análise de variância (ANOVA) usando o pacote *Expdes.pt*. Os comandos *plot(fitted(x))*, *resid(x)* e *qqnorm* do pacote *drc* foram utilizados para verificação da distribuição da normalidade dos resíduos. Os dados foram ajustados pelo modelo log-logístico de quatro parâmetros usando o comando *modelFit* do pacote *drc* (Ritz *et al.*, 2015). As doses dos herbicidas que causaram redução de 50% no controle visual (C₅₀) e na massa fresca ou seca da parte aérea (GR₅₀) foram estimadas usando o modelo:

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \exp[b(\log x - \log e)]}$$

onde: *c* e *d* são as assíntotas de mínima e máxima resposta da curva, *b* é a inclinação da curva, *e* é a dose que causa 50% de redução na resposta de *y* (C₅₀ ou GR₅₀) e *x* é a dose do herbicida. Quando as doses não foram suficientes para o controle 100% das plantas, o C₅₀ foi calculado substituindo o valor de *y* por 50. A diferença entre o comportamento das curvas em resposta aos herbicidas nos experimentos foi calculada através do fator de resistência (FR). A diferença estatística entre os FR das variáveis controle aos 21 DAA (C₅₀), massa fresca da parte aérea (GR₅₀) e massa seca da parte aérea (GR₅₀) foi calculada utilizando o comando *EDcomp* do pacote *drc*. Os gráficos foram realizados utilizando o pacote *ggplot2* (Wickham, 2016) e os intervalos de confiança de cada curva foram calculados através do comando *predict* e plotados em toda a curva, conforme recomendado por Ritz *et al.* (2015). Os dados de percentagem de controle foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

A análise estatística para inferir sobre possível evolução da resistência cruzada ou múltipla foi realizada pela quantificação da diferença de percentagem de sobreviventes entre

as gerações G0 e G2 selecionada com fenoxaprope, imazetapir e mistura de ambos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ. Os valores de sobrevivência foram submetidos à análise do teste χ^2 . A hipótese nula foi que a sobrevivência esperada de capim-arroz após a aplicação de cada herbicida testado seria igual nas gerações G0 e G2 selecionadas. Comparação entre as proporções de sobrevivência da G0 e G2 selecionadas foi realizada pelo teste χ^2 de heterogeneidade, como proposto por Busi e Powles (2017), utilizando o *software* estatístico *R* com o comando *prop.test*, à 5% de probabilidade de erro. Os comandos utilizados para todas as análises estatísticas descritas acima estão dispostos no Apêndice 1.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Definição de subdoses

A interação entre os fatores biótipos e doses do herbicida fenoxaprope foi significativa apenas para a variável massa fresca da parte aérea (Apêndice 6). Os biótipos MOST e CAMAQ foram suscetíveis ao fenoxaprope apresentando reduções nas variáveis controle visual, massa fresca e massa seca da parte aérea nas doses mais baixas da recomendada (Figura 3A, C e E). O biótipo CAMAQ foi mais suscetível ao fenoxaprope apresentando menores valores de GR₅₀ (12,1 g ha⁻¹) da massa fresca (Tabela 3). A interação entre os fatores biótipos e doses do herbicida imazetapir foram significativos (Apêndice 6). O biótipo CAMAQ não foi controlado pelo herbicida (Figura 3B, D e F). A dose de 640 g ha⁻¹ de imazetapir (6,4 vezes a recomendada) não proporcionou controle satisfatório das plantas desse biótipo, resultando em FR de 4,4 (Figura 3 e Tabela 3), caracterizando este biótipo como resistente ao imazetapir. Esses resultados comprovam a resistência do biótipo CAMAQ e suscetibilidade do biótipo MOST de forma similar ao encontrado em outros estudos (Matzenbacher *et al.*, 2015a). O sequenciamento do gene *ALS* e experimento com inibidores de enzimas P450 foram realizados para avaliação do mecanismo de resistência no biótipo CAMAQ.

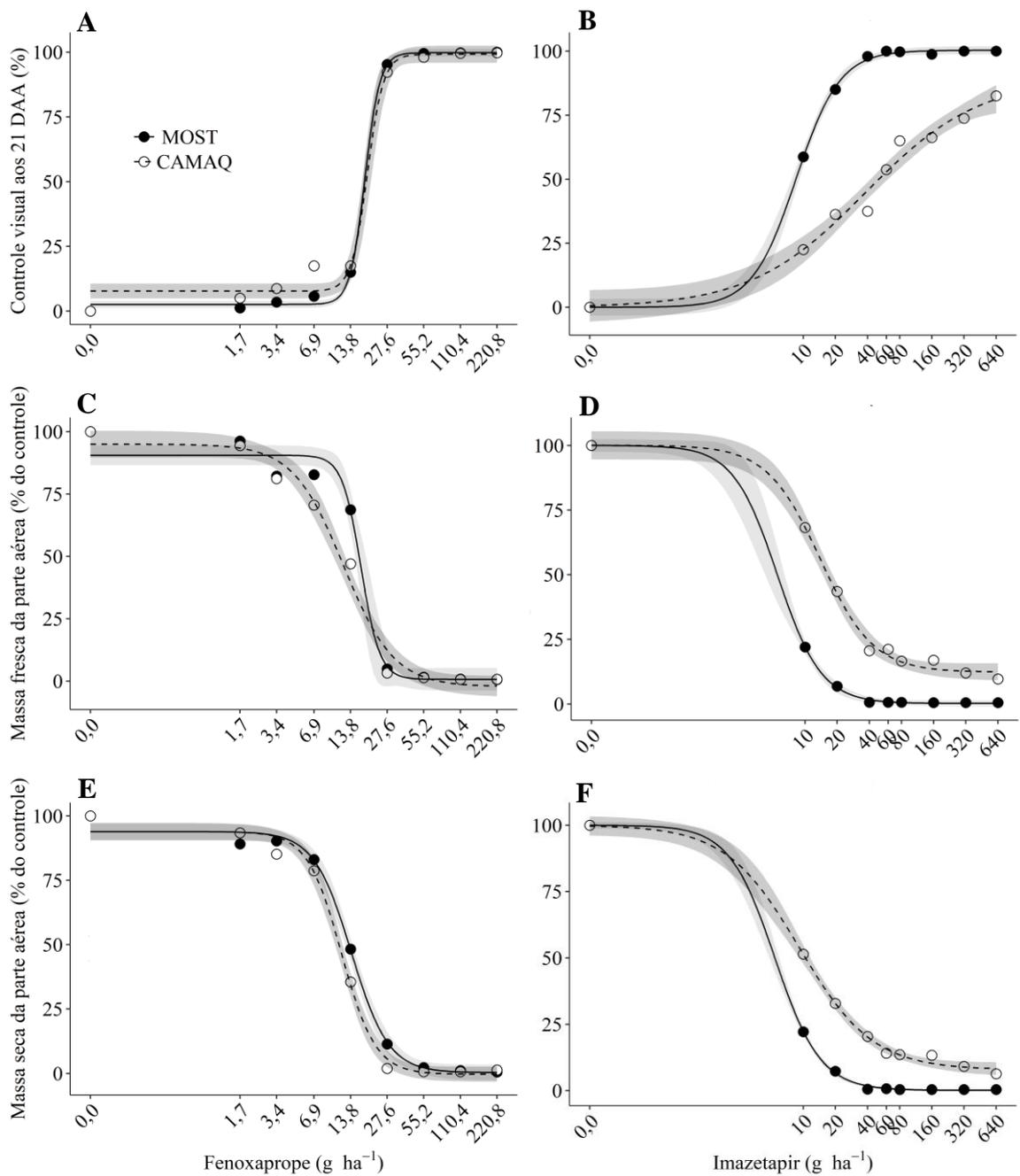


FIGURA 3. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B), massa fresca (% do controle) (C e D) e massa seca da parte aérea (% do controle) (E e F) dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ em resposta à aplicação dos herbicidas fenoxaprop (A, C e E) e imazetapir (B, D e F).

A interação entre os fatores biótipos e doses das misturas foi significativa para as variáveis controle visual, massa fresca e seca da parte aérea nas três proporções testadas (Apêndice 6). O biótipo CAMAQ apresentou menor controle em relação ao MOST quando a proporção das doses foi maior do herbicida fenoxaprop (75% de fenoxaprop e 25% de imazetapir), no entanto, o controle dos biótipos foi satisfatório (Figura 4A, D e E) (Tabela 4). Na proporção de 75% de imazetapir e 25% de fenoxaprop, o biótipo CAMAQ foi menos controlado em relação às outras proporções da mistura (Figura C, F e I), possivelmente

devido à maior proporção do herbicida imazetapir. Em geral, a proporção de mistura que resultou em melhor significância dos parâmetros (dados não apresentados) e melhor comportamento das curvas para ambos os biótipos foi a proporção de 50% de fenoxaprope + 50% de imazetapir (Figura 4 B, E e H).

TABELA 3. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea das plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ submetidas às diferentes doses dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir.

Herbicida	Biótipo	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle aos 21 DAA-----							
fenoxaprope	MOST	-7,1	2,6	99,8	18,1	±1,3	-
	CAMAQ	-6,2	7,7	99,2	18,9	±1,3	1,0
imazetapir	MOST	-2,1	-1,0	100,3	8,5	±1,1	-
	CAMAQ	-0,8	-0,9	89,4	38	±13,2	4,4*
-----massa fresca da parte aérea-----							
fenoxaprope	MOST	5,6	0,7	90,7	16,8	±1,7	-
	CAMAQ	2,1	-2,1	94,9	12,1	±1,8	0,7*
imazetapir	MOST	2,1	0,2	99,9	5,5	±1,9	-
	CAMAQ	1,7	12,3	100,0	13,9	±1,4	2,5*
-----massa seca da parte aérea-----							
fenoxaprope	MOST	2,8	0,4	93,8	13,9	±1,6	-
	CAMAQ	3,1	-0,3	93,9	11,6	±1,4	0,8
imazetapir	MOST	2,0	0,1	99,9	5,4	±1,2	-
	CAMAQ	1,2	7,9	100	9,2	±0,9	1,7*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca ou massa seca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo CAMAQ tratado com fenoxaprope ou imazetapir/C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo MOST tratado com fenoxaprope ou imazetapir. *p<0,05 pelo teste F.

A partir dos resultados obtidos através das curvas de dose-resposta isoladas dos herbicidas fenoxaprope, imazetapir e com as diferentes proporções das misturas, as subdoses de cada herbicida foram escolhidas para iniciar a seleção das plantas para obtenção das gerações e para estudo de sobrevivência. As doses escolhidas foram 13,8; 17,25 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprope, 2, 4 e 8 g ha⁻¹ de imazetapir e 0,8+5, 1,7+10 e 3,4+20 g ha⁻¹ de fenoxaprope + imazetapir para o biótipo MOST. Para o biótipo CAMAQ as doses escolhidas foram 6,9; 13,8 e 20,7 g ha⁻¹ de fenoxaprope, 80, 160, 320 g ha⁻¹ de imazetapir e 3,4+20, 6,9+30 e 10,35+35 g ha⁻¹ de fenoxaprope + imazetapir.

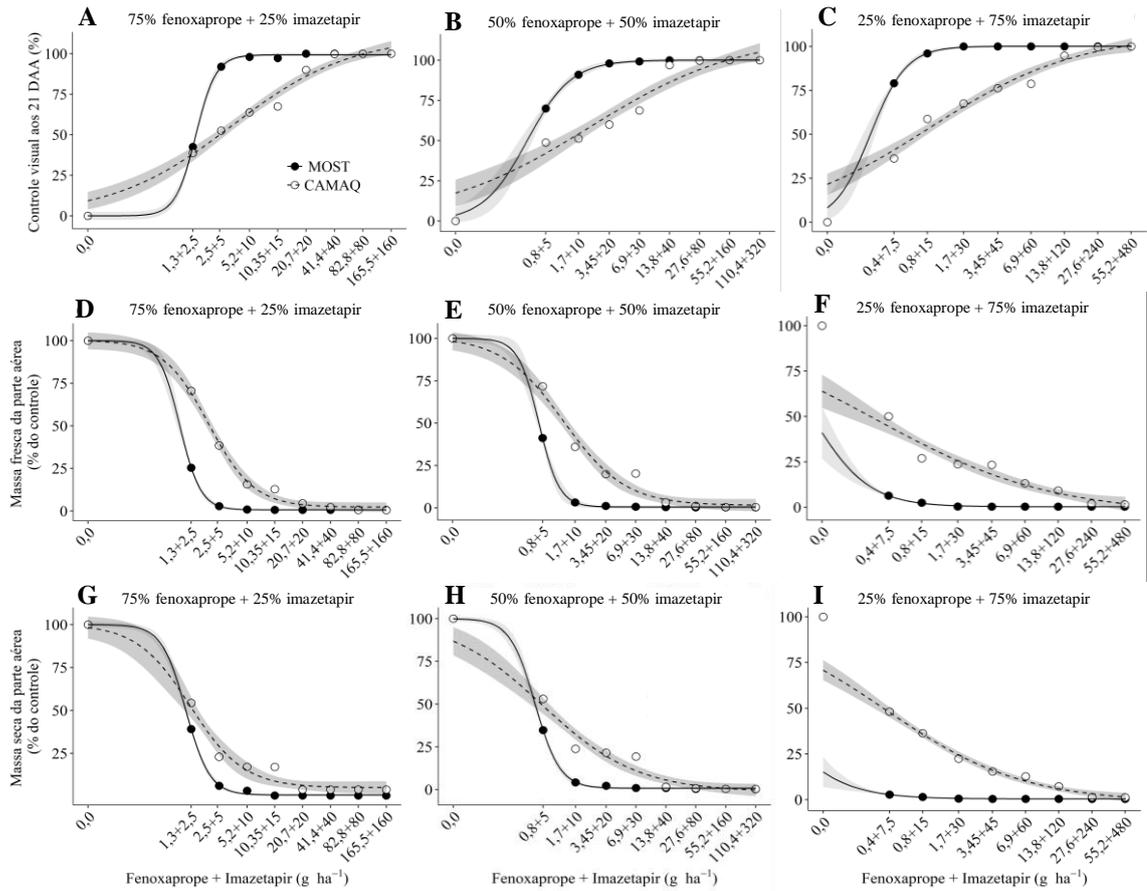


FIGURA 4. Controle visual aos 21 DAA (%) (A, B e C), massa fresca (% do controle) (D, E e F) e massa seca da parte aérea (G, H e I) dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ em resposta à aplicação da associação dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir em diferentes proporções: 75% de fenoxaprope + 25% de imazetapir (A, D e G); 50% de fenoxaprope + 50% de imazetapir (B, E e H) e 25% de fenoxaprope + 75% de imazetapir (C, F e I).

TABELA 4. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea das plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ submetidas às diferentes proporções da mistura dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir.

Herbicida	Biótipo	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle aos 21 DAA-----							
75 % fenoxaprope + 25 % imazetapir	MOST CAMAQ	-4,0 -0,6	0,0 0,3	99,3 110,8	1,4+2,7 3,4+6,5	±0,1 ±0,9	- 2,4*
50 % fenoxaprope + 50 % imazetapir	MOST CAMAQ	-1,9 -0,6	0,0 0,7	100,1 116,0	0,5+3,1 2,2+13,7	±0,2 ±0,9	- 4,4*
25 % fenoxaprope + 75 % imazetapir	MOST CAMAQ	-2,7 -0,6	0,0 -0,3	100,1 107,3	0,2+3,7 0,8+15	±0,1 ±0,2	- 4,0*
-----massa fresca da parte aérea-----							
75 % fenoxaprope + 25 % imazetapir	MOST CAMAQ	3,8 1,7	0,6 2,2	99,9 100,4	0,9+1,7 1,9+3,8	±0,2 ±0,1	- 2,1*
50 % fenoxaprope + 50 % imazetapir	MOST CAMAQ	4,2 1,4	0,5 1,4	100,0 100,9	0,7+4,4 1,3+8,1	±0,1 ±0,1	- 1,8*
25 % fenoxaprope + 75 % imazetapir	MOST CAMAQ	1,7 0,5	0,3 -3,7	99,9 100,1	0,08+1,5 0,31+5,6	±0,02 ±0,1	- 3,8*
-----massa seca da parte aérea-----							
75 % fenoxaprope + 25 % imazetapir	MOST CAMAQ	3,5 1,5	0,7 5,0	100,0 100,3	1,1+2,1 1,3+2,5	±0,1 ±0,2	- 1,1
50 % fenoxaprope + 50 % imazetapir	MOST CAMAQ	3,5 0,9	0,8 -1,3	100,0 100,2	0,7+4,4 0,8+5,0	±0,1 ±0,1	- 1,1
25 % fenoxaprope + 75 % imazetapir	MOST CAMAQ	0,9 0,7	0,2 -1,4	99,9 100,0	0,006+0,1 0,4+7,5	±0,0 ±0,04	- 66,6*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca ou massa seca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo CAMAQ tratado com a mistura de fenoxaprope + imazetapir/C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo MOST tratado com a mistura de fenoxaprope + imazetapir. *p<0,05 pelo teste F.

4.3.1 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz

Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram eficientes na obtenção dos fragmentos esperados (Figura 5). Os *primers* produziram fragmentos únicos, a partir dos quais, foi possível realizar a purificação do cDNA direto no produto PCR. As bandas do produto PCR resultantes da amplificação dos *primers* ALS4 (Figura 5E), ALS5 (Figura 5F) e ALS6 (Figura 5G) resultaram em bandas mais fortes. Isto ocorreu possivelmente pela adição do *enhancer* no protocolo da amplificação destes *primers*. O *enhancer* é utilizado para melhorar a especificidade dos primers, principalmente em regiões ricas em CG, caso da região frontal do gene *ALS* de capim-arroz.

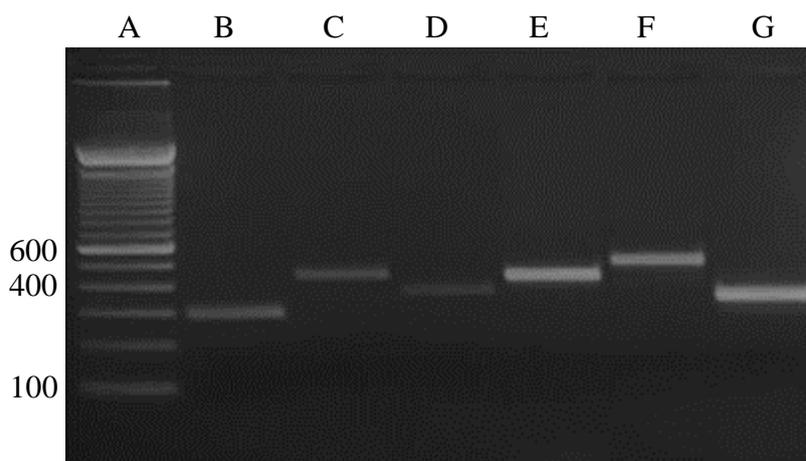


FIGURA 5. Produto da amplificação dos *primers* ALS1 (B), ALS2 (C), ALS3(D), ALS4(E), ALS5(F) e ALS6 (G) do gene *ALS* dos biótipos MOST e CAMAQ, separados por gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb foi utilizado (A).

Os fragmentos obtidos do gene *ALS* apresentaram tamanho de 1666 e 1674 pb para os biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. Em outros trabalhos, o tamanho do gene *ALS* em *Echinochloa crus-galli* foi identificado em ter tamanho de aproximadamente 1900pb (Iwakami *et al.*, 2015). O menor tamanho obtido no presente estudo se deve ao fato dos primers terem sido desenhados para amplificar apenas a região codificante do gene, não amplificando a extremidade inicial e final do gene. O primer *forward* ALS6, primeiro *primer* da parte frontal do gene *ALS* desenhado, foi pareado a partir da posição 260pb do gene (Figura 1). O desenho de *primers* para amplificar a região inicial (0 a 260pb) a partir do cDNA não teve sucesso pelo fato de ser uma região rica em CG.

Echinochloa crus-galli é uma espécie alohexaplóide e apresenta no seu genoma três cópias do gene *ALS* (ALS1, ALS2 e ALS3) (Iwakami *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2017). As sequências do gene *ALS* dos biótipos MOST e CAMAQ apresentaram homologia de 98,2% entre si e apresentaram identidade de 97, 98 e 99% com a sequência depositada do gene *ALS1* (LC006058.1), *ALS2* (LC006059.1), *ALS3* (LC006062.1) de *E. crus-galli* e de 98% com a sequência depositada do gene *ALS1* (AB636580.1) de *E. phyllopogon*. Com a sequência do gene *ALS* de *Arabidopsis thaliana* (X51514) as sequências apresentaram homologia de aproximadamente 57%.

As sequências do gene *ALS* do biótipo suscetível MOST e do resistente CAMAQ não apresentaram polimorfismo (Apêndice 7). No alinhamento com o gene *ALS* de *A. thaliana* (Apêndice 7) não foram encontradas mutações tanto nas regiões que naturalmente são conhecidas por causar resistência aos herbicidas inibidores da ALS quanto nas regiões onde

mutações obtidas artificialmente são associadas à resistência (Apêndice 7). Na análise do cromatograma não foi identificado nenhum resultado de heterozigose nas posições citadas acima. O fato de o sequenciamento ter sido realizado com base em cDNA demonstra que o gene ou cópias do gene *ALS* expressas na planta não apresentam mutações no DNA nas posições associadas com resistência aos herbicidas. Portanto, a resistência do biótipo CAMAQ ao herbicida imazetapir não é relacionada a mutação no gene codificante da enzima ALS.

4.3.2 Avaliação da ocorrência de incremento de metabolização através de inibidores

A interação entre os fatores inibidores e doses foi significativa para as variáveis controle aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea dos biótipos MOST e CAMAQ (Apêndice 8). O resultado da ANOVA indica diferença no controle dos biótipos devido a aplicação de inibidores de P450.

O inibidor malathion proporcionou maior controle do biótipo MOST, mesmo esse apresentando alta sensibilidade ao herbicida de forma isolada (Figura 6A, C e E). Esse resultado mostra que em pequenas doses o biótipo suscetível apresenta capacidade de metabolização através de enzimas P450. Efeito de inibidores no maior controle em biótipos suscetíveis já foram obtidos em outros estudos com capim-arroz (Dalazen *et al.*, 2018b; Wright *et al.*, 2018). A aplicação dos inibidores malathion e PBO causaram um aumento no controle do biótipo CAMAQ (Figura 6B, D e F). Os inibidores malathion e PBO reverteram o FR de resistência do biótipo para valores menores que 0,4 e 0,3 (Tabela 5). Os resultados indicam que a resistência do biótipo CAMAQ ao herbicida imazetapir está associada ao incremento de metabolização por enzimas do citocromo P450, embora outro mecanismo de resistência pode estar envolvido.

A ocorrência de biótipos de capim-arroz resistentes aos herbicidas inibidores da ALS aumentou consideravelmente ao longo dos últimos anos e vários trabalhos tentam identificar os mecanismos envolvidos (Matzenbacher *et al.*, 2015a; Rouse *et al.*, 2018; Heap, 2019). O incremento de detoxificação de moléculas herbicidas é o mecanismo mais encontrado em relação à resistência aos herbicidas inibidores da ALS e ACCase (Bakkali *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2016; Dalazen *et al.*, 2018b). Enzimas do citocromo P450, principalmente da família CYP81 e CYP72, são as mais importantes em plantas de capim-arroz com esse mecanismo de resistência (Yun *et al.*, 2005; Iwakami *et al.*, 2014b; Guo *et al.*, 2017; Dalazen *et al.*, 2018a; Iwakami, 2018; Iwakami *et al.*, 2019). De mesmo modo, enzimas da família GST também foram indicadas como candidatas na conjugação dos herbicidas com glutamato

em capim-arroz (Wright *et al.*, 2018). O mecanismo de resistência por metabolização é o mais preocupante no controle de plantas daninhas devido à capacidade das enzimas detoxificantes em metabolizar moléculas herbicidas nunca antes utilizadas (Ghanizadeh e Harrington, 2017b). No entanto, o entendimento ainda é pequeno dos fatores que possam estar associados para a rápida evolução da resistência aos herbicidas nessa espécie.

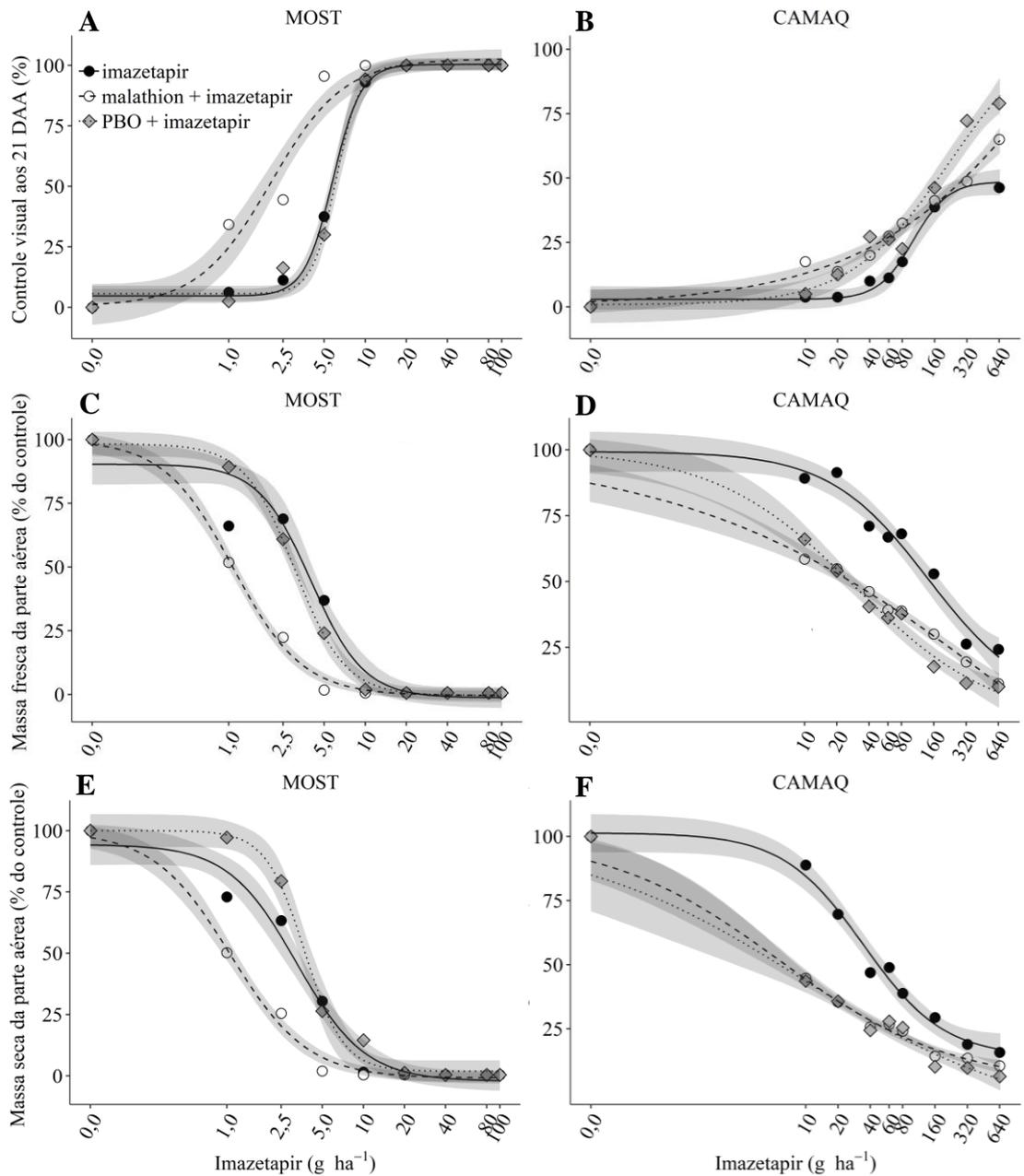


FIGURA 6. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B), massa fresca (% do controle) (C e D) e massa seca da parte aérea (% do controle) (E e F) dos biótipos de capim-arroz MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em resposta à aplicação de inibidores de enzimas P450 (malathion e PBO) 2 horas antes da aspersão do herbicida imazetapir.

TABELA 5. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA, massa fresca e seca da parte aérea das plantas de capim-arroz dos biótipos MOST e CAMAQ submetidas à aplicação prévia dos inibidores (malathion e PBO) ao herbicida imazetapir.

Biótipo	Tratamento	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle aos 21 DAA-----							
MOST	imazetapir	-4,2	4,7	100,3	5,7	±0,3	-
	imazetapir + malathion	-1,7	3,4	102,5	2,1	±0,4	0,4*
	imazetapir + PBO	-4,9	5,6	100,4	6,1	±0,5	1,1
CAMAQ	imazetapir	-2,6	3,0	48,6	>640	±4,5	-
	imazetapir + malathion	-0,5	0,6	187,3	255,1	±2,3	<0,4*
	imazetapir + PBO	-0,9	0,9	110,92	218,4	±4,3	<0,3*
-----massa fresca da parte aérea-----							
MOST	imazetapir	2,2	-1,2	90,3	4,0	±0,5	-
	imazetapir + malathion	1,7	-0,4	99,8	1,1	±0,1	0,2*
	imazetapir + PBO	2,3	-0,3	98,3	3,0	±0,3	0,75
CAMAQ	imazetapir	0,9	2,2	99,5	150,7	±3,5	-
	imazetapir + malathion	0,5	2,1	99,4	26,9	±7,8	0,2*
	imazetapir + PBO	0,7	-3,2	99,7	26,31	±10,3	0,2*
-----massa seca da parte aérea-----							
MOST	imazetapir	1,7	-2,1	94,2	3,2	±0,6	-
	imazetapir + malathion	1,5	-0,9	99,8	1,1	±0,2	0,3*
	imazetapir + PBO	3,1	1,9	99,9	3,7	±0,4	1,1
CAMAQ	imazetapir	0,8	2,3	102,61	49,1	±10,4	-
	imazetapir + malathion	0,5	3,4	100,03	5,9	±3,2	0,12*
	imazetapir + PBO	0,5	-1,5	99,89	6,8	±3,1	0,14*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca ou massa seca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo MOST ou CAMAQ tratado previamente com os inibidores (malathion ou PBO) ao imazetapir/C₅₀ ou GR₅₀ do biótipo MOST ou CAMAQ tratado com imazetapir sem inibidor. *p<0,05 pelo teste F.

4.3.3 Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ

A seleção das plantas de capim-arroz através de subdoses do herbicida fenoxaprop causou maior sobrevivência das plantas das gerações G2 dos biótipos MOST (Tabela 6) e CAMAQ (Tabela 7) em comparação com a G0 e G1 após a aplicação dos herbicidas. De forma diferente, a aplicação de subdoses de imazetapir não causou esse efeito no biótipo suscetível MOST, em que a sobrevivência da geração G1 foi maior que a sobrevivência da G2 na dose de 15g. A sobrevivência do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de doses de

imazetapir foi maior de 95% em praticamente cada geração de seleção, demonstrando que a resistência a esse herbicida apresenta alto grau de estabilidade e que a população está praticamente 100% em homozigose devido às gerações de autofecundação. Por outro lado, quando ocorreu a aplicação recorrente utilizando subdoses da mistura dos herbicidas, o controle diminuiu consideravelmente ao passar das gerações, principalmente para o biótipo resistente CAMAQ (Tabela 6 e 7). A dose de 3,45 + 20 g de fenoxaprope + imazetapir controlou aproximadamente 60% das plantas da geração G0 do biótipo MOST (Tabela 6). Após apenas um ciclo de seleção, esse controle diminuiu para aproximadamente 15,5% das plantas da G1. Os resultados indicam aumento da sobrevivência das plantas selecionadas com a mistura dos herbicidas de ambos os biótipos.

TABELA 6. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo MOST em relação à aplicação dos herbicida fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).

Herbicida	G*	Dose aplicada (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Plantas aplicadas	Sobreviventes (%)	Plantas selecionadas
Fenoxaprope	0	13,8 (20)	165	19,64	-
	0	17,25 (25)	173	13,85	15
	0	20,7 (30)	159	2,46	-
	1	17,25 (25)	140	17,64	15
	1	20,7 (30)	100	1,04	-
	1	24,15 (35)	112	0	-
	2	13,8 (20)	186	35,75	-
	2	17,25 (25)	172	24,25	-
	2	20,7 (30)	176	6,82	-
Imazetapir	0	2 (2)	161	100	-
	0	4 (4)	160	94	-
	0	8 (8)	132	70,21	15
	1	8 (8)	194	96,05	-
	1	10 (10)	199	75,8	-
	1	15 (15)	215	57,83	15
	2	15 (15)	193	34,49	-
	2	25 (25)	188	15,06	-
	2	35 (35)	193	12,88	-
Fenoxaprope + Imazetapir	0	0,862 (1,25) + 5 (5)	160	100	-
	0	1,725 (2,5) + 10 (10)	153	82,23	-
	0	3,45 (5,0) + 20 (20)	134	43,5	15
	1	3,45 (5,0) + 20 (20)	214	84,5	-
	1	5,175 (7,5) + 25(25)	232	60,25	-
	1	6,9 (10) + 30 (30)	227	42,42	15
	2	6,9 (10) + 30 (30)	174	44,44	-
	2	13,8 (20) + 40 (40)	186	2,04	-
	2	20,7 (30) + 60 (60)	179	1,68	-

*Gerações de seleção.

O menor controle através do uso da mistura ocorreu para o biótipo CAMAQ (Tabela 7). A dose de 27,6 + 80g de fenoxaprope + imazetapir controlou aproximadamente 70% das plantas da geração G1 e reduziu o controle para menos de 30% das plantas da geração G2. Além disso, observou-se que a sobrevivência foi maior que 59,4% das plantas da G2 após a aplicação das doses de 41,4 + 160g de fenoxaprope + imazetapir (Tabela 7), demonstrando um ganho do biótipo CAMAQ na capacidade de metabolizar esses herbicidas.

TABELA 7. Sobrevivência das gerações G0, G1 e G2 do biótipo CAMAQ em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).

Herbicida	G*	Dose aplicada (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Plantas aplicadas	Sobreviventes (%)	Plantas selecionadas
Fenoxaprope	0	6,9 (10)	182	93,32	-
	0	13,8 (20)	176	33,39	15
	0	20,7 (30)	183	2,7	-
	1	13,8 (20)	223	15,63	-
	1	20,7 (30)	212	1,89	8
	1	27,6 (40)	224	1,39	-
	2	13,8 (20)	316	23,6	-
	2	20,7 (30)	196	7,2	-
	2	27,6 (40)	211	5,41	-
Imazetapir	0	80 (80)	170	99,46	-
	0	160 (160)	181	96,6	-
	0	320 (320)	166	96,99	15
	1	320 (320)	220	100	-
	1	480 (480)	235	97,5	-
	1	640 (640)	221	92,78	15
	2	640 (640)	219	99	-
	2	1060 (1060)	22	95,44	-
	2	1280 (1280)	248	96,47	-
Fenoxaprope + Imazetapir	0	3,45 (5) + 20 (20)	168	97,74	-
	0	6,9 (10) + 30 (30)	172	96,66	-
	0	10,35 (15) + 35 (35)	165	66,33	15
	1	10,35 (15) + 35 (35)	213	83,7	-
	1	20,7 (30) + 60 (60)	199	25,18	-
	1	27,6 (40) + 80 (80)	196	23,01	15
	2	27,6 (40) + 80 (80)	246	74,6	-
	2	34,5 (50) + 100 (100)	240	68,18	-
	2	41,4 (60) + 160 (160)	221	59,48	-

*Gerações de seleção.

A seleção de plantas através do uso de subdoses proporciona maior sobrevivência nas progênies devido ao incremento de metabolização mediada por enzimas de detoxificação

(Neve e Powles, 2005b; Yu *et al.*, 2013; Yu e Powles, 2014). Herbicidas inibidores da ACCase, principalmente do grupo químico ariloxifenoxipropionatos (FOP's), são conhecidos pela rápida capacidade da evolução da resistência por metabolização (Neve e Powles, 2005a; Busi *et al.*, 2013; Busi *et al.*, 2016). Por outro lado, trabalhos relacionados à seleção com subdoses de herbicidas inibidores da enzima ALS são escassos. Existe um crescente número de identificação de espécies de plantas daninhas resistentes a esse mecanismo de ação (Heap, 2019) e a maioria dos casos é devido ao incremento de metabolização (Dalazen *et al.*, 2018a; Rouse *et al.*, 2018). Assim, o estudo de seleção de plantas com subdoses de herbicidas inibidores da ALS é importante para determinação das causas da evolução da resistência a estes produtos por processos de metabolização.

No presente estudo, o aumento das doses de imazetapir em cada geração de seleção no biótipo MOST não possibilitou uma comparação de sobrevivência entre as gerações (Tabela 6). O aumento da sobrevivência das plantas após as aplicações de imazetapir não foi considerável, embora a sobrevivência da geração G1 tenha sido maior do que a G0, principalmente na dose de 8g de imazetapir (Tabela 6). No entanto, quando este herbicida foi associado ao fenoxaprope, o aumento da sobrevivência de plantas ocorreu nas gerações seguintes para ambos os biótipos (Tabela 6 e 7). Os resultados indicam que a prática do uso da mistura dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir em subdoses potencializa a maior sobrevivência das plantas e, isto provavelmente ocorre devido a capacidade de um dos componentes da mistura ativar genes de detoxificação para metabolização do outro herbicida. O biótipo CAMAQ é resistente por metabolização ao imazetapir e os genes responsáveis por esta detoxificação podem estar agindo também sobre as moléculas do herbicida fenoxaprope, proporcionando maior sobrevivência nesse biótipo em comparação ao MOST. Para tanto, estudos de expressão de genes candidatos deverão ser realizados para testar essa hipótese.

4.3.4 Curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas

A interação entre os fatores gerações e doses dos herbicidas fenoxaprope, imazetapir e mistura foi significativa para as variáveis controle aos 21 DAA, massa fresca e massa seca da parte aérea para os biótipos MOST e CAMAQ (Apêndice 9). O controle da geração G2 selecionada com fenoxaprope foi significativamente reduzido em comparação a G0, tanto para o biótipo MOST (Figura 7A e 8) como para CAMAQ (Figura 7B e 10). Os valores de FR das gerações G2 selecionadas desses biótipos foram de 3,2 e 1,8, respectivamente,

demonstrando esse efeito, embora a dose de 27,6g do herbicida fenoxapropre tenha proporcionado o controle satisfatório (Tabela 8) (Figura 8 e 10).

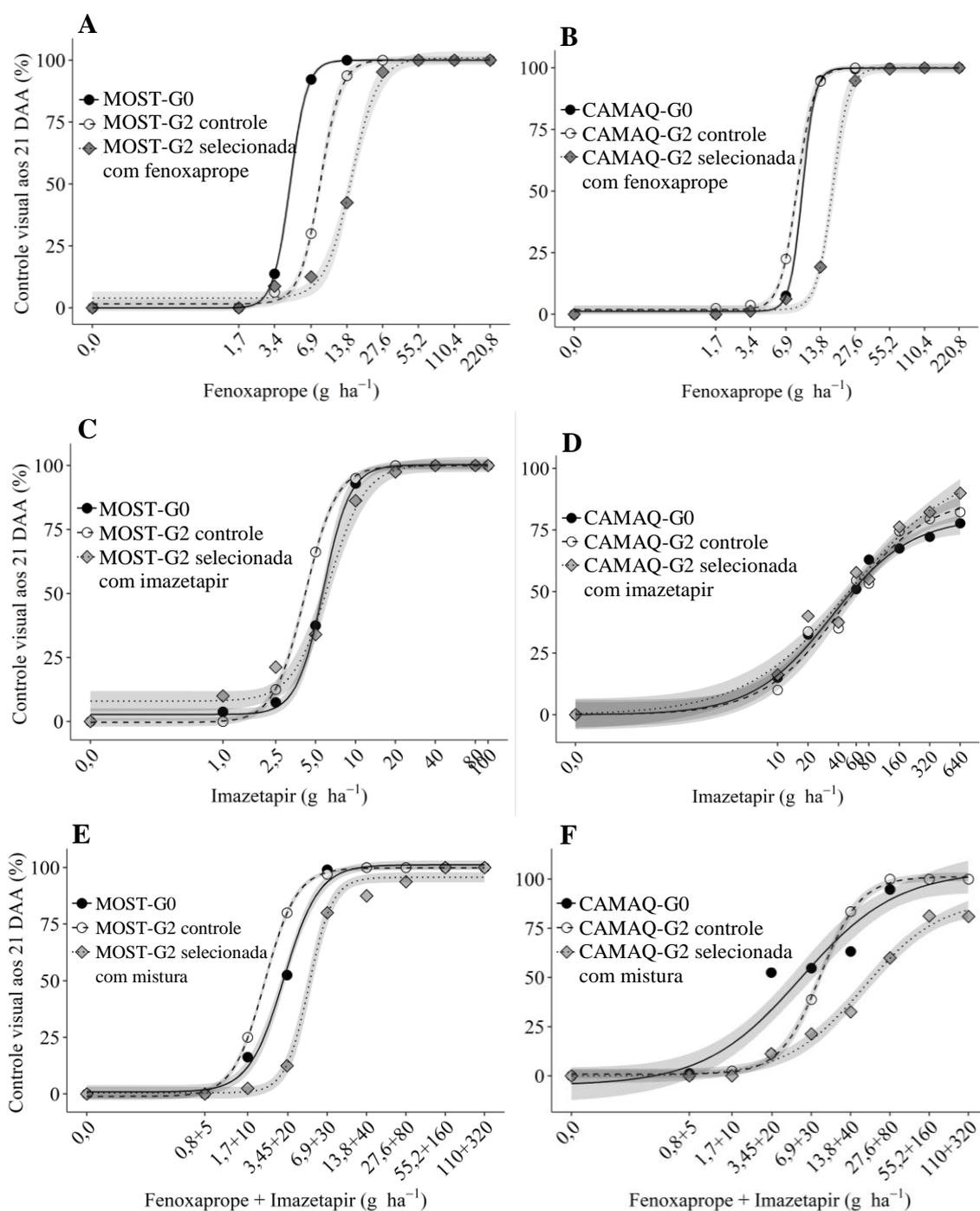


FIGURA 7. Controle visual aos 21 DAA (%) das gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas de capim-arroz do biótipo MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em relação à aplicação do herbicida fenoxapropre (A e B), imazetapir (C e D) e mistura (fenoxapropre + imazetapir) (E e F).

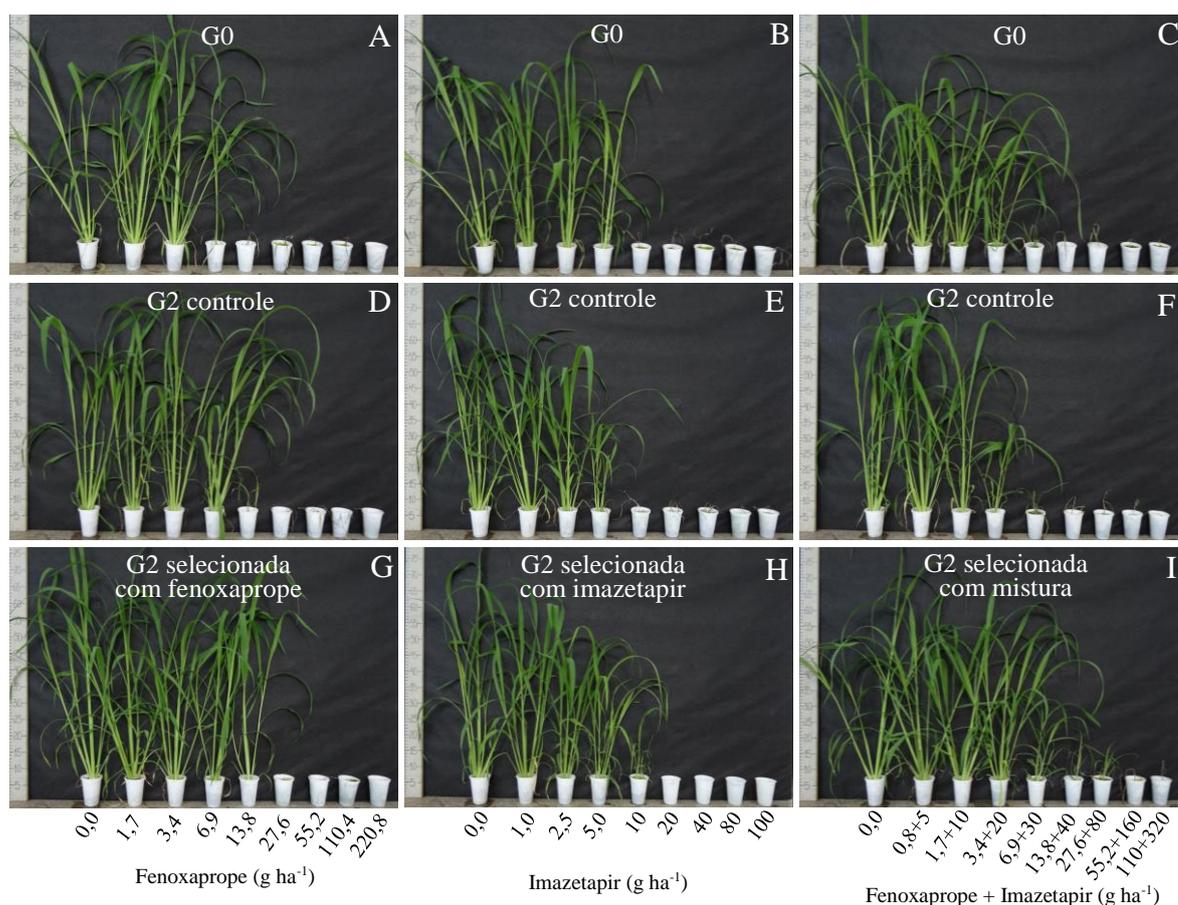


FIGURA 8. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo MOST-G0 (A, B, C), G2 controle (D, E e F) e G2 selecionada com fenoxaprop (G), imazetapir (H) e mistura (I) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprop (A, D e G), imazetapir (B, E e H) e mistura (fenoxaprop + imazetapir) (C, F e I). Fotos aos 21 DAA.

O controle das plantas da geração G2 selecionadas com imazetapir foi similar a geração G0 em ambos os biótipos (Figura 7C e D, 8 e 10). Embora o C_{50} da geração G2 (6,2 g ha⁻¹) do biótipo MOST seja maior que a G0 (5,7 g ha⁻¹), esse valor não foi significativo (Tabela 8). As plantas da G2 controle (não selecionada) foram significativamente mais suscetíveis ao herbicida (Figura 7C). Este comportamento também ocorreu com o biótipo CAMAQ, resistente ao herbicida, nas maiores doses de 320 e 640g de imazetapir, embora não significativamente (Figura 7D). De forma geral, as plantas selecionadas com imazetapir não mostraram nenhuma redução de controle diferente das plantas da geração G0, ao contrário do que ocorreu com as plantas selecionadas com subdoses do herbicida fenoxaprop (Tabela 8).

TABELA 8. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável controle visual aos 21 DAA das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, imazetapir e mistura submetidas às diferentes doses de fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).

Biótipo	Geração	Herbicida aplicado	b	c	d	C ₅₀		FR
						Dose (g ha ⁻¹)	IC	
MOST	G0	fenoxaprope	-6,1	-0,1	100,1	4,6	±0,2	-
	G2 controle		-4,9	1,5	100,2	8,2	±0,3	1,8*
	G2 selecionada com fenoxaprope		-3,9	3,9	100,9	15,1	±0,5	3,2*
	G0	imazetapir	-4,3	4,1	100,2	5,7	±1,0	-
	G2 controle		-3,6	-0,4	99,9	4,2	±0,7	0,7*
	G2 selecionada com imazetapir		-3,0	6,8	100,6	6,2	±0,5	1,1
	G0	mistura	-3,2	0,7	101,2	3,2+18,8	±0,2	
	G2 controle		-3,6	-0,8	99,8	2,3+13,5	±0,1	0,7*
	G2 selecionada com mistura		-4,9	0,7	95,6	5,1+24,8	±0,3	1,6*
CAMAQ	G0	fenoxaprope	-8,1	1,2	99,9	9,6	±0,4	
	G2 controle		-5,9	1,9	100,0	8,6	±0,5	0,9
	G2 selecionada com fenoxaprope		-6,3	1,7	99,9	17,6	±0,7	1,8*
	G0	imazetapir	-1,1	0,1	80,0	34,3	±8,9	
	G2 controle		-1,1	-0,3	88,3	44,7	±11,3	1,3
	G2 selecionada com imazetapir		-0,8	-0,2	101,9	53,1	±21,5	1,5
	G0	mistura	-1,2	-4,5	104,2	5,8+26,8	±1,3	
	G2 controle		-2,9	1,5	101,1	8,1+31,7	±0,8	1,4*
	G2 selecionada com mistura		-1,5	0,1	89,9	17,3+50,1	±4,3	3,1*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ da G2 controle (não selecionada) ou G2 selecionada/C₅₀ da G0 (não selecionada) dentro de cada biótipo e herbicida. *p<0,05 pelo teste F.

As plantas de capim-arroz da G2 selecionadas com subdoses de mistura foram mais tolerantes em comparação a G0 e G2 controle (Figura 7E e F, 8 e 10). O controle dessas plantas G2 selecionadas foi significativamente reduzido em ambos os biótipos. As plantas do biótipo CAMAQ foram mais tolerantes, sendo que o FR referente ao C₅₀ foi de 3,1, em comparação a 1,6 do biótipo MOST (Tabela 8). As maiores doses da associação dos herbicidas, como 55,2 + 160 e 110 + 320g de fenoxaprope + imazetapir, respectivamente, não proporcionaram controle total das plantas G2 selecionadas do biótipo CAMAQ (Figura 7F e 10).

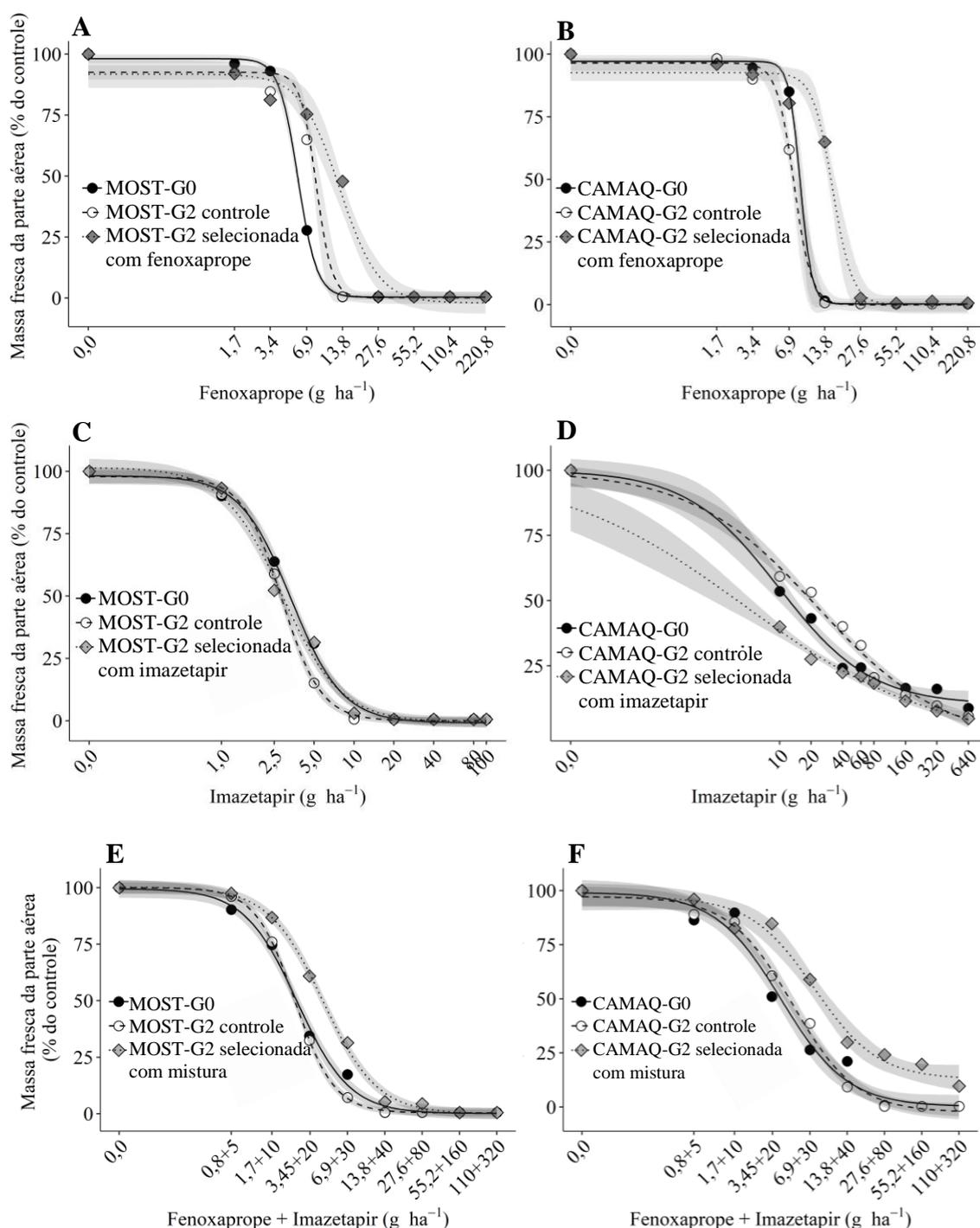


FIGURA 9. Massa fresca da parte aérea (% do controle) das gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas de capim-arroz do biótipo MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprop (A e B), imazetapir (C e D) e mistura (fenoxaprop + imazetapir) (E e F).

A massa fresca da parte aérea em relação à aplicação dos herbicidas apresentou resultados semelhantes ao controle visual descrito anteriormente (Figura 9). As plantas da G2 selecionadas com subdoses do herbicida fenoxaprop apresentaram menores reduções da massa fresca para ambos os biótipos (Figura 9A e B, 8 e 10). O FR do biótipo MOST

(2,4) foi maior do que o biótipo CAMAQ (1,9) (Tabela 8). O peso da massa fresca da geração G2 do biótipo MOST selecionada com imazetapir foi similar à G0 após a aplicação das doses do herbicida (Figura 9C). No entanto, a massa fresca das plantas da geração G2 do biótipo CAMAQ selecionada com imazetapir foi significativamente reduzida em comparação as plantas da geração G0 (Figura 9D). Esta maior redução da massa fresca resultou em FR de 0,5 em comparação à G0, ou seja, essas plantas foram mais suscetíveis, mesmo sendo progênies de plantas selecionadas com o herbicida. Isso corrobora os resultados encontrados na variável controle visual (Figura 7). Além disso, a massa fresca das plantas da G2 controle (sem seleção) foi menos reduzida em comparação com a testemunha, obtendo FR significativo de 2,3 (Tabela 9), efeito contrário do que se espera sem a pressão de seleção imposta pelo herbicida. Vale salientar que esse biótipo é resistente ao herbicida e o seu comportamento está provavelmente relacionado ao efeito de variação de adaptação que pode ser causada pela resistência por metabolização (Vila-Aiub *et al.*, 2009). A geração G2 de ambos os biótipos selecionadas com mistura apresentaram menores reduções do peso da massa fresca da parte aérea (Figura 8, 9 e 10). As plantas da geração G2 selecionadas do biótipo CAMAQ foram mais tolerantes à aplicação da mistura dos herbicidas, apresentando FR de 1,8, em comparação com a G2 selecionada com mistura do biótipo MOST, que obteve FR de 1,6. A variável massa seca da parte aérea se comportou de forma semelhante à variável massa fresca (Apêndice 10). As massas secas das plantas das gerações G2 selecionadas tanto com subdoses de fenoxaprope quanto com mistura de ambos os biótipos foram menos reduzidas em comparação à G0. A massa seca das gerações G2 dos biótipos selecionadas com imazetapir foram reduzidas de forma similar à geração G0 (Apêndice 10).

Os resultados evidenciam evolução para a maior tolerância nas progênies através do uso de seleção com subdoses dos herbicidas fenoxaprope e mistura (Figura 7). A maior tolerância pelas plantas daninhas aos herbicidas após seleção recorrente com subdoses de herbicidas inibidores da enzima ACCase já foram identificadas em *Lolium rigidum* (Neve e Powles, 2005b), *Avena fatua* (Busi *et al.*, 2016) e *Brachipodium distachylon* (Matzrafi *et al.*, 2014). A seleção com subdoses de 2,4-D e dicamba também proporcionaram menores controles nas progênies de biótipos das espécies *Raphanus raphanistrum* e *Amaranthus palmeri*, respectivamente (Busi e Powles, 2017; Tehranchian *et al.*, 2017). No entanto, este é o primeiro trabalho que estuda o efeito da mistura de herbicidas como fator para evolução da resistência em plantas. A maior tolerância das plantas da G2 selecionadas tanto com fenoxaprope quanto com a mistura de fenoxaprope + imazetapir (Figura 8 e 10) está, possivelmente, associada à maior capacidade de detoxificação dos herbicidas adquirida nas progênies (Ghanizadeh e Harrington, 2017a). Existe grande variabilidade genética dentro

de uma população de plantas em relação à sensibilidade aos herbicidas (Busi e Powles, 2009). Característica de resistência poligênica, devido à recombinação de alelos, pode ser adquirida durante as gerações, especialmente e de forma mais rápida, em espécies de polinização cruzada (Neve e Powles, 2005a). Em espécies autógamas, como em *E. crus-galli*, *A. fatua* e *B. distachylon*, espera-se que esse processo seja mais lento (Matzrafi *et al.*, 2014; Busi *et al.*, 2016). Com os resultados obtidos no presente estudo, essa evolução para a resistência ocorre e os resultados mostram o risco potencial para a resistência na espécie autógama *E. crus-galli* através da aplicação recorrente de herbicidas.

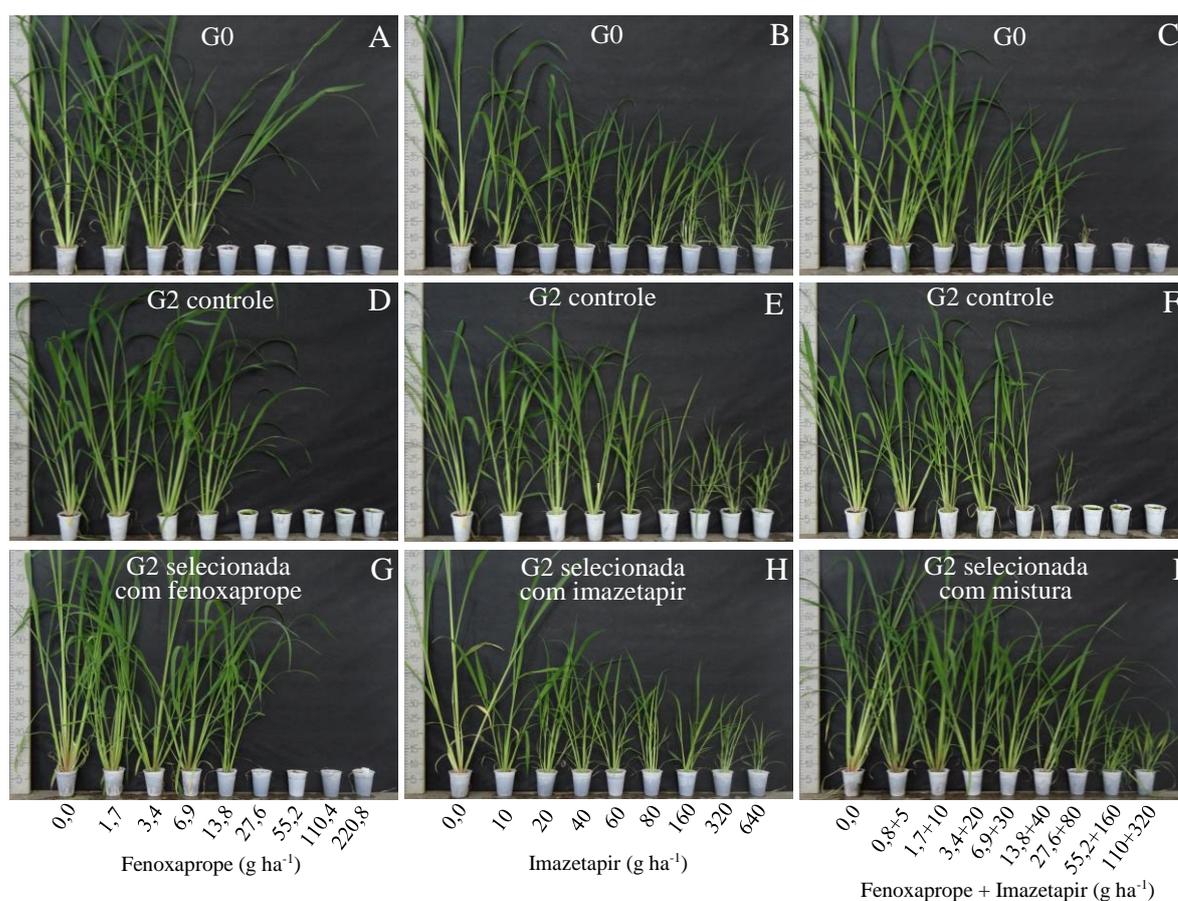


FIGURA 10. Representação das curvas de dose-resposta com as gerações do biótipo CAMAQ-G0 (A, B, C), G2 controle (D, E e F) e G2 selecionada com fenoxaprop (G), imazetapir (H) e mistura (I) em relação à aplicação dos herbicidas fenoxaprop (A, D e G), imazetapir (B, E e H) e mistura (fenoxaprop + imazetapir) (C, F e I). Fotos aos 21 DAA.

A seleção dos biótipos de capim-arroz com subdoses de imazetapir isolado, principalmente o suscetível MOST, não resultou em aumento da tolerância ao herbicida nas progênies G2 (Figura 8, Tabela 8). A maioria dos casos de resistência por metabolização em capim-arroz ocorre aos herbicidas dos grupos químicos sulfonilureia (azimsulfuron),

triazolopirimidina (penoxsulam) e pirimidiniltiobenzoatos (bispiribaque) (Iwakami *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2017; Iwakami *et al.*, 2019). Um dos fatores que pode estar favorecendo a evolução da resistência por metabolização a esses herbicidas é a utilização de subdoses (Rissel e Ulber, 2018). A seleção de *Apera spica-venti* com subdoses de iodosulfuron, herbicida do grupo químico das sulfonilureias, foi capaz de evoluir para a resistência dessa espécie a esse herbicida em apenas duas gerações e seis genes *CYPs* foram identificados como sendo candidatos pela maior detoxificação (Rissel e Ulber, 2018).

TABELA 9. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, imazetapir e mistura submetidas às diferentes doses de fenoxaprope, imazetapir e mistura (fenoxaprope + imazetapir).

Biótipo	Geração	Herbicida aplicado	b	c	d	GR ₅₀		FR	
						Dose (g ha ⁻¹)	IC		
MOST	G0	fenoxaprope	5,4	0,4	98,1	5,8	±0,4	-	
	G2 controle		6,5	0,1	92,5	8,3	±0,8	1,4*	
	G2 selecionada com fenoxaprope		2,6	-1,9	91,7	13,1	±1,3	2,4*	
	G0	imazetapir	2,2	-0,8	98,2	3,3	±0,5	-	
	G2 controle		2,9	0,1	97,8	2,8	±0,9	0,8	
	G2 selecionada com imazetapir		1,9	-0,5	101,5	2,8	±0,7	0,8	
	G0	mistura	2,0	0,1	99,6	2,7+15,8	±0,2	-	
	G2 controle		2,7	0,3	100,0	2,6+15,3	±0,3	0,9	
	G2 selecionada com mistura		1,9	-0,1	100,3	4,3+22,4	±0,3	1,6*	
	CAMAQ	G0	fenoxaprope	9,0	0,3	97,1	8,6	±1,3	-
		G2 controle		5,9	-0,1	96,4	7,6	±0,4	0,9
		G2 selecionada com fenoxaprope		5,2	0,1	92,5	16,0	±0,9	1,9*
G0		imazetapir	0,9	10,1	99,9	9,8	±1,9	-	
G2 controle			0,7	-4,1	99,6	22,7	±5,9	2,3*	
G2 selecionada com imazetapir			0,4	-3,7	100,0	4,5	±1,9	0,5*	
G0		mistura	1,6	0,2	99,2	4,0+21,6	±0,6	-	
G2 controle			1,7	-2,5	97,2	5,0+24,4	±0,8	1,2	
G2 selecionada com mistura			1,7	12,8	97,11	7,5+32,6	±1,3	1,8*	

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca; IC: intervalo de confiança do parâmetro GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = GR₅₀ da G2 controle (não selecionada) ou G2 selecionada/GR₅₀ da G0 (não selecionada) dentro de cada biótipo e herbicida. * $p<0,05$ pelo teste F.

Os herbicidas inibidores da enzima ALS do grupo químico das imidazolinonas são citados como tendo a menor taxa de metabolização devido ao longo período que a molécula necessita ficar no sítio de ação para ter eficiência em razão da sua baixa afinidade com a enzima alvo (Garcia *et al.*, 2017). No entanto, esse maior tempo necessário para atingir a eficiência herbicida dentro da planta pode favorecer a detoxificação pelas enzimas. Alguns trabalhos relatam a resistência de capim-arroz por metabolização aos herbicidas do grupo das imidazolinonas, imazetapir e imazamox (Riar *et al.*, 2013; Matzenbacher *et al.*, 2015a). Genes citocromo P450 como *CYP81A6* e também *GST* foram identificados como candidatos pela metabolização do herbicida em biótipo de capim-arroz resistente (Dalazen *et al.*, 2018a e b). No entanto, o uso de subdoses a partir deste herbicida como fator de seleção não proporcionou evolução da resistência por metabolização (Figura 8 e Tabela 8). Deste modo, duas possibilidades surgem: (1) a evolução para resistência por metabolização desse herbicida necessita de maiores números de ciclos de seleções em comparação aos herbicidas inibidores da ACCase ou, (2) outro fator de seleção, e não subdoses, pode estar causando o aumento de metabolização a este grupo químico em biótipos resistentes. A seleção recorrente com subdoses de imazetapir nos biótipos MOST e CAMAQ deverá ser continuada para testar a primeira hipótese.

Uma das principais estratégias sugeridas para evitar a resistência ou controlar biótipos de plantas resistentes nas lavouras tem sido a utilização da mistura ou rotação de mecanismos de ação (Beckie e Harker, 2017). Os resultados do presente trabalho indicam que a aplicação da mistura de fenoxaprope + imazetapir em proporções adequadas (27,6 + 80; 55,2 + 160; 110 + 320 g ha⁻¹ de fenoxaprope + imazetapir, respectivamente, Figura 7) apresentam efeito sinérgico e controlam o biótipo resistente CAMAQ de forma satisfatória (Tabela 4 e Figura 4). No entanto, o uso de subdoses da mistura quando não atinge o controle apresenta potencial para diminuir a sensibilidade aos herbicidas nas progênies, tanto no biótipo suscetível MOST quanto no resistente CAMAQ. A maior redução do controle pela aplicação da mistura foi encontrada nas plantas da G2 selecionadas do biótipo CAMAQ (Figura 10). As enzimas do citocromo P450, responsáveis pela resistência por metabolização do biótipo CAMAQ, têm possivelmente grande papel na maior tolerância da G2 em comparação ao suscetível MOST. Após a identificação de plantas resistentes na lavoura, a prática de associar outro herbicida na aplicação é umas das mais utilizadas (Gazziero, 2015). Caso o controle não seja satisfatório, progênies das plantas sobreviventes poderão apresentar maior capacidade de metabolizar os produtos da mistura no próximo ciclo, podendo em poucas gerações serem capazes de metabolizar a dose recomendada de cada herbicida, como visto nos resultados do presente trabalho (Tabela 8 e Figura 10).

4.3.5 Caracterização da evolução da resistência a outros herbicidas

A sobrevivência das gerações do biótipo MOST foi diferente para os herbicidas diclofope (Figura 14), quincloraque (Figura 15), glifosato e paraquate (Tabela 10). A diferença da sobrevivência entre as gerações do biótipo CAMAQ ocorreu para os herbicidas diclofope (Figura 14), clodinafope, cialofope, setoxidim, quincloraque (Figura 15) e paraquate (Tabela 11). Não foi verificado diferença na sobrevivência de plantas entre as gerações para os herbicidas penoxsulam e propanil.

As gerações G2 selecionadas com fenoxaprope, imazetapir e mistura apresentaram maiores sobrevivências em comparação a G0 após a aplicação de fenoxaprope (Figura 11), imazetapir (Figura 12) e mistura (Figura 13), respectivamente. As plantas de ambos biótipos de capim-arroz das gerações G2 selecionadas com estes herbicidas foram mais tolerantes (Tabela 10 e 11). Os resultados da sobrevivência das gerações G2 selecionadas com fenoxaprope (Figura 11) e mistura (Figura 13) corroboram os resultados encontrados no experimento anterior de curva de dose-resposta (Tabela 8) e indicam potencial destes herbicidas para evoluir para a resistência através de seleções com subdoses. Por outro lado, a maior sobrevivência da G2 do biótipo MOST selecionada com subdoses de imazetapir (Figura 12B) não foi verificada no experimento de curva de dose-resposta (Figura 7). Isso ocorreu, possivelmente, por ter sido utilizado pequeno número de plantas (4 plantas) no experimento de curva de dose-resposta e neste experimento de sobrevivência a população foi de 52 plantas. Desta forma, a seleção de capim-arroz através de subdoses de imazetapir proporcionou aumento na sobrevivência em relação às subdoses, indicando que este efeito pode ser maior nas próximas gerações de seleção.

As plantas da geração G2 selecionadas com subdoses de mistura, de ambos os biótipos de capim-arroz, foram mais tolerantes ao herbicida diclofope (Figura 14) (Tabela 10 e 11). A sobrevivência dessa geração do biótipo MOST foi de 96%, valor significativamente superior aos 20 % de sobrevivência da geração G0 (Tabela 10). Do mesmo modo, a geração G2 selecionada com mistura do biótipo CAMAQ apresentou sobrevivência de 90% e a G0 de 50% após aplicação do herbicida (Tabela 11). De modo geral, a seleção de capim-arroz com subdoses de mistura de fenoxaprope + imazetapir proporcionou aumento da tolerância nas progênies ao herbicida diclofope. Esse resultado confirma os encontrados em *Chlamydomonas reinhardtii*, em que a aplicação de subdoses de mistura de herbicidas apresenta potencial para evolução da resistência cruzada (Lagator *et al.*, 2013). Portanto, experimento de curva de dose-resposta com este herbicida foi realizado com as gerações para comprovar este efeito e está discutido no item posterior.

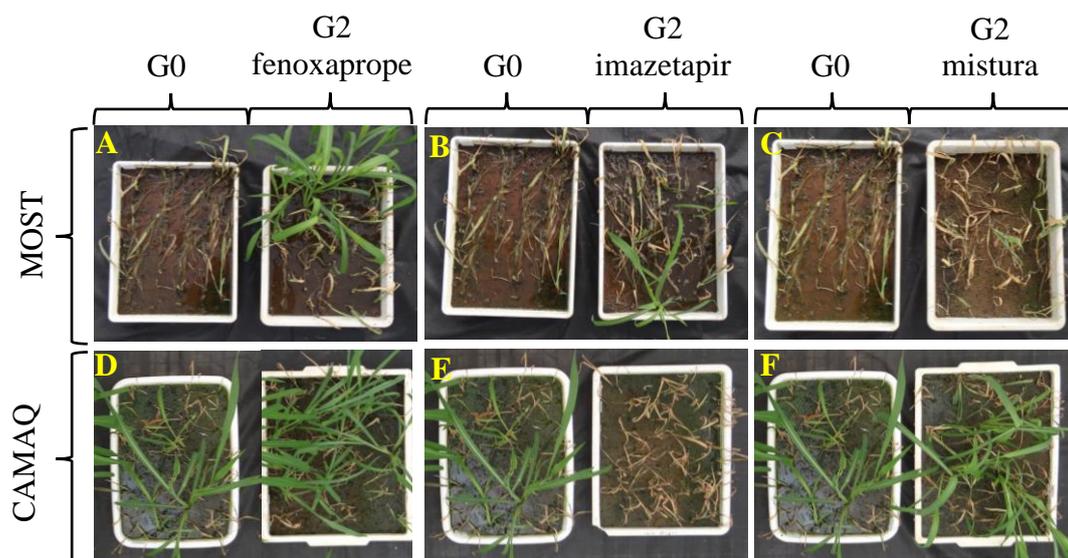


FIGURA 11. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 17,25 e 20 g ha⁻¹ de fenoxapropre nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropre; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropre; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura.

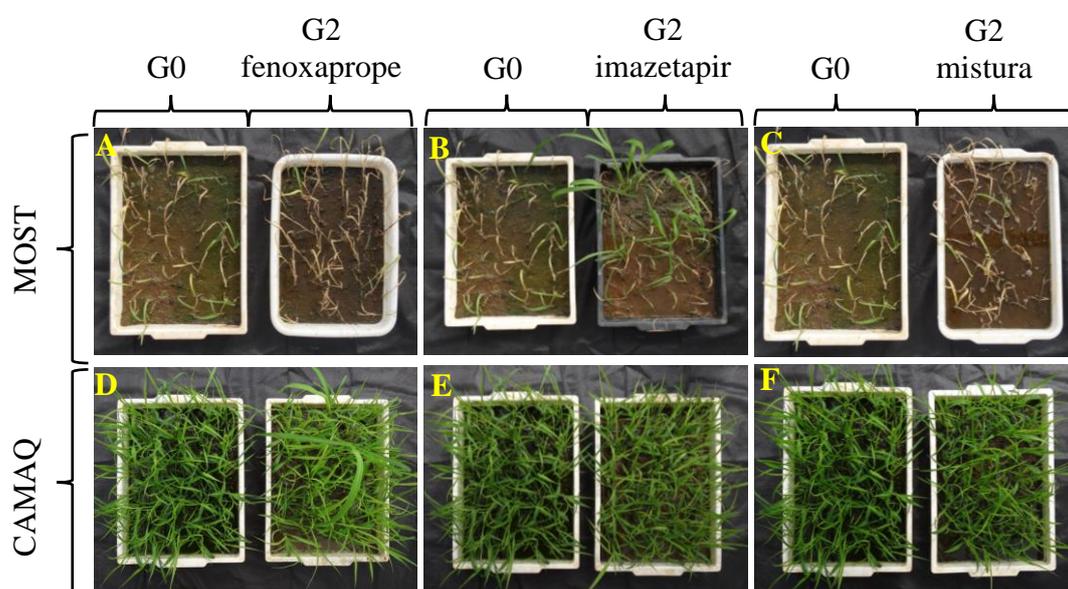


FIGURA 12. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 20 e 200 g ha⁻¹ de imazetapir nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxapropre; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxapropre; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura.

A aplicação dos herbicidas clodinafope, cialofope e setoxidim controlaram praticamente 100% das plantas de todas as gerações do biótipo MOST (Tabela 10). Diferenças nas sobrevivências entre as gerações a esses herbicidas ocorreram apenas para o biótipo CAMAQ (Tabela 11). As plantas da geração G2 do biótipo CAMAQ selecionada com fenoxaprope foram mais tolerantes ao clodinafope, apresentando sobrevivência de 49%, superior à G0 de 26,1% (Tabela 11). Para o herbicida cialofope foi verificado que a sobrevivência de todas as gerações G2 selecionadas foram superiores à G0. As plantas da geração G2 selecionadas com mistura foram as mais tolerantes ao cialofope, atingindo mais de 80% de sobrevivência (Tabela 11). Evolução da resistência ao herbicida setoxidim foi verificada pela maior sobrevivência das gerações G2 selecionadas com imazetapir e mistura (Tabela 11). As plantas da geração G2 selecionadas com mistura apresentaram sobrevivência maior que 40% em comparação à G0 que apresentou apenas 10% de plantas sobreviventes após a aplicação de setoxidim (Tabela 11). Evolução para resistência cruzada através da seleção com subdoses de herbicidas também foi verificada na espécie *Avena fatua* (Busi *et al.*, 2016). A seleção com subdoses de diclofope proporcionou evolução para a resistência múltipla aos herbicidas mesosulfuron e imazapir + imazapic nesta espécie (Busi *et al.*, 2016). Plantas de *Amaranthus palmeri* também evoluíram para resistência ao dicamba após seleção recorrente com subdoses de 2,4D (Tehranchian *et al.*, 2017). A resistência aos herbicidas inibidores da ACCase do grupo químico ciclohexanodiona, como setoxidim, é principalmente relacionada à mutação no gene alvo (Tehranchian *et al.*, 2018) e nenhum estudo até o momento relatou envolvimento de metabolização na resistência a esses herbicidas. Portanto, este é o primeiro caso reportado de potencial evolução para resistência ao herbicida setoxidim a partir da utilização de subdoses de imazetapir e mistura de fenoxaprope + imazetapir. Outros estudos como análise de curva de dose-resposta nas gerações mais avançadas de seleção deverão ser realizados para melhor identificação dessa característica.

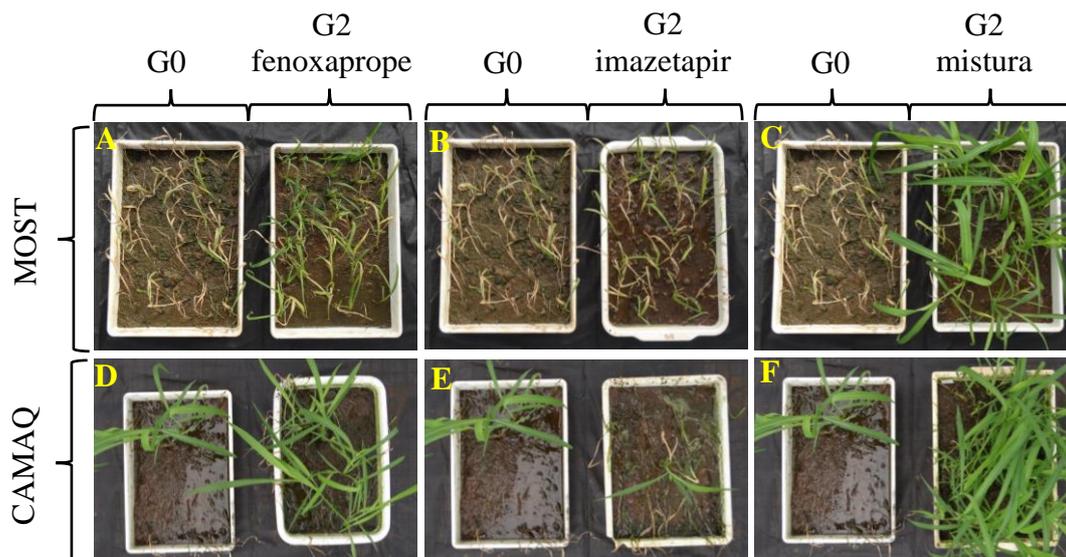


FIGURA 13. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 6,9 + 30 e 34,5 + 100 g ha⁻¹ de fenoxaprop + imazetapir nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura.

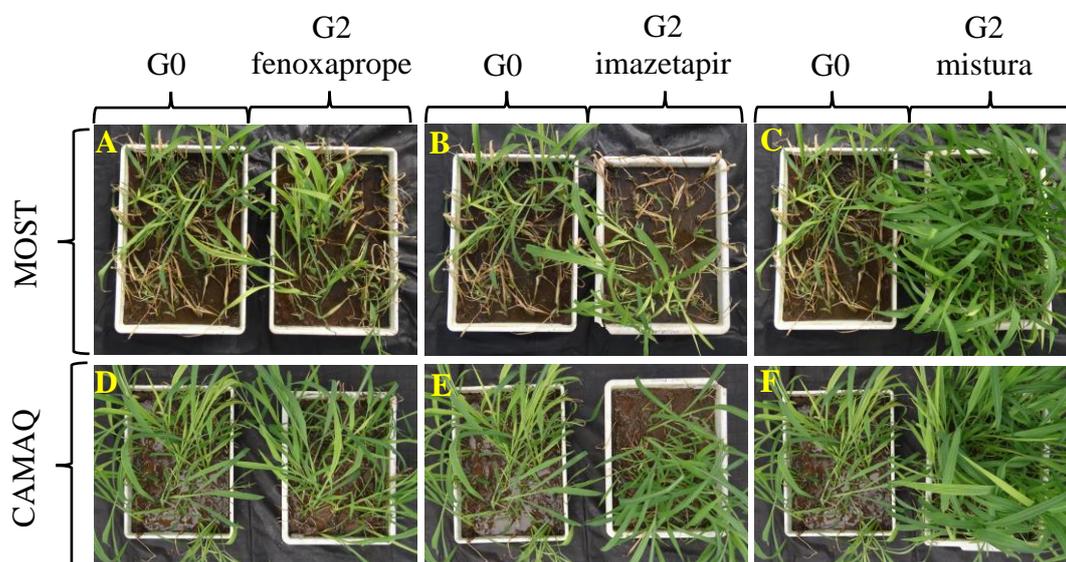


FIGURA 14. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 298 g ha⁻¹ de diclofop nos biótipos MOST e CAMAQ. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura.

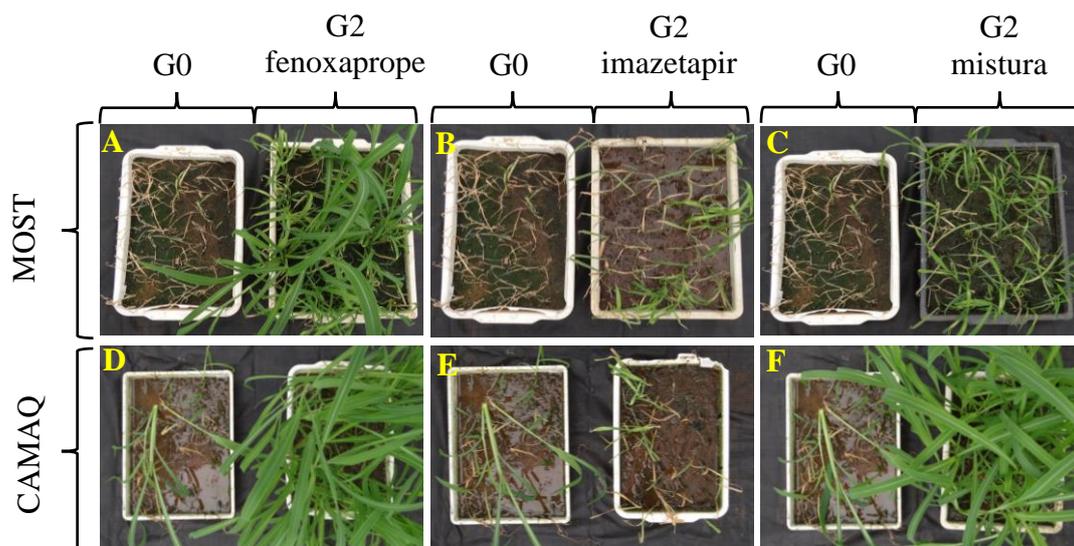


FIGURA 15. Representação da sobrevivência das gerações de capim-arroz aos 14DAA em relação à aplicação de 262,5 e 375 g ha⁻¹ de quincloraque nos biótipos MOST e CAMAQ, respectivamente. (A) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com fenoxaprop; (B) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com imazetapir; (C) MOST-G0 e MOST-G2 selecionada com mistura; (D) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com fenoxaprop; (E) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com imazetapir; (F) CAMAQ-G0 e CAMAQ-G2 selecionada com mistura.

As plantas da geração G2 selecionadas com fenoxaprop e mistura de fenoxaprop + imazetapir foram mais tolerantes ao quincloraque do que à geração G0 (Tabela 10 e 11). A maior sobrevivência ocorreu na G2 selecionada com fenoxaprop e as gerações selecionadas com imazetapir foram controladas de forma similar às plantas da geração G0 (Tabela 10 e 11). A maior evolução da resistência ao quincloraque ocorreu com o biótipo CAMAQ, por apresentar sobrevivência maior que 65% das plantas da geração G2 selecionadas com fenoxaprop mesmo quando aplicado a dose recomendada de quincloraque (375 g ha⁻¹) (Figura 15). Portanto, a seleção de capim-arroz com subdoses do herbicida fenoxaprop isolado ou em mistura com imazetapir proporciona evolução para a resistência múltipla ao herbicida quincloraque. Esse resultado explica o rápido desenvolvimento de resistências múltiplas a estes herbicidas em biótipos de capim-arroz e também em outras espécies de plantas daninhas através da maior metabolização (Matzenbacher *et al.*, 2015a; Busi *et al.*, 2017; Dellaferrera *et al.*, 2018). A utilização de herbicidas de outros mecanismos de ação para controlar planta daninha resistente apresenta potencial para evolução da resistência a outros herbicidas. Isto fica evidente pela maior tolerância ao herbicida quincloraque do biótipo resistente CAMAQ devido à seleção com subdoses da mistura de fenoxaprop + imazetapir (Tabela 11).

TABELA 10. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com a mistura dos herbicidas do biótipo MOST em relação à aplicação de outros herbicidas.

Herbicida	Dose (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Geração	Plantas tratadas	Plantas sobr. (%)	χ^2	p*
Fenoxaprope-p-etílico	17,25 (25%)	G0 (não selecionada)	52	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	7 (14,0)	5,77	0,016
		G2 selecionada com imazetapir	50	2 (4,0)	0,55	0,457
		G2 selecionada com mistura	47	1 (2,3)	<0,001	0,959
Imazetapir	30 (30%)	G0 (não selecionada)	47	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	57	1 (1,7)	<0,001	1
		G2 selecionada com imazetapir	52	7 (13,4)	4,91	0,026
		G2 selecionada com mistura	51	1 (1,9)	<0,001	1
Mistura (Fenoxaprope + Imazetapir)	6,9 (10%) + 30 (30%)	G0 (não selecionada)	51	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	51	18 (35,2)	19,49	<0,001
		G2 selecionada com imazetapir	50	2 (4,0)	0,53	0,460
		G2 selecionada com mistura	49	11 (22,4)	10,67	0,001
Diclofop- metílico	298 (35%)	G0 (não selecionada)	50	10 (20,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	48	11 (22,9)	0,01	0,916
		G2 selecionada com imazetapir	50	12 (24,0)	0,05	0,809
		G2 selecionada com mistura	50	48 (96,0)	56,19	<0,001
Clodinafop- propargil	9 (35%)	G0 (não selecionada)	48	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com imazetapir	50	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com mistura	48	0 (0,0)	-	-
Cialofop- butílico	57 (25%)	G0 (não selecionada)	45	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	1 (2,0)	<0,001	1
		G2 selecionada com imazetapir	45	1 (2,2)	<0,001	1
		G2 selecionada com mistura	45	1 (2,2)	<0,001	1
Setoxidim	92 (50%)	G0 (não selecionada)	45	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	49	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com imazetapir	49	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com mistura	43	0 (0,0)	-	-
Penoxsulam	48 (100%)	G0 (não selecionada)	48	0(0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com imazetapir	50	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com mistura	48	0 (0,0)	-	-
Quincloraque	262,5 (70%)	G0 (não selecionada)	48	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	25 (50,0)	29,64	<0,001
		G2 selecionada com imazetapir	48	5 (10,4)	3,37	0,060
		G2 selecionada com mistura	48	17 (35,4)	18,29	<0,001
Glifosato	370 (50%)	G0 (não selecionada)	48	0 (0,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	45	30 (66,6)	44,23	<0,001
		G2 selecionada com imazetapir	46	15 (32,6)	16,27	<0,001
		G2 selecionada com mistura	48	9 (18,7)	7,84	0,005
Paraquate	75 (25%)	G0 (não selecionada)	50	12 (24,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	1 (2,0)	8,84	0,002
		G2 selecionada com imazetapir	48	1 (2,1)	8,4	0,003
		G2 selecionada com mistura	48	2 (4,2)	6,33	0,011
Propanil	3600 (100%)	G0 (não selecionada)	50	24 (48,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	48	14 (29,2)	2,9	0,088
		G2 selecionada com imazetapir	50	34 (68,0)	3,32	0,068
		G2 selecionada com mistura	51	18 (35,3)	1,19	0,270

*Valor p indica a probabilidade de rejeitar a hipótese nula (hipótese nula = sem diferença entre a geração G0 (parental) e as gerações G2 (G2 selecionada com fenoxaprope, imazetapir ou mistura). Plantas sobr.: plantas sobreviventes. Mistura: fenoxaprope + imazetapir.

TABELA 11. Sobrevivência das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com a mistura dos herbicidas do biótipo CAMAQ em relação à aplicação de doses de outros herbicidas.

Herbicida	Dose (g ha ⁻¹) (% dose recomendada)	Geração	Plantas tratadas	Plantas sobr. (%)	χ^2	p*
Fenoxaprope- p-etílico	20 (30%)	G0 (não selecionada)	50	3 (7,5)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	11 (22,0)	4,06	0,043
		G2 selecionada com imazetapir	50	0 (0,0)	1,90	0,168
		G2 selecionada com mistura	48	4 (8,3)	<0,001	0,990
Imazetapir	200 (200%)	G0 (não selecionada)	50	50 (100,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	49 (98,0)	<0,001	0,990
		G2 selecionada com imazetapir	48	47 (97,9)	<0,001	0,980
		G2 selecionada com mistura	48	46 (95,8)	0,55	0,457
Mistura (Fenoxaprope + Imazetapir)	34,5 (50%) + 100 (100%)	G0 (não selecionada)	43	2 (4,6)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	60	5 (8,3)	0,11	0,737
		G2 selecionada com imazetapir	48	1 (2,0)	0,009	0,920
		G2 selecionada com mistura	61	27 (44,2)	17,75	<0,001
Diclofope- metílico	298 (35%)	G0 (não selecionada)	37	19 (51,3)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	54	22 (40,7)	0,61	0,430
		G2 selecionada com imazetapir	47	16 (34,0)	1,88	0,160
		G2 selecionada com mistura	50	45 (90,0)	14,40	<0,001
Clodinafope- propargil	9 (35%)	G0 (não selecionada)	42	11 (26,1)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	53	26 (49,0)	4,23	0,039
		G2 selecionada com imazetapir	49	12 (24,4)	<0,001	0,990
		G2 selecionada com mistura	45	21 (46,6)	3,08	0,078
Cialofope- butílico	57 (25%)	G0 (não selecionada)	40	2 (5,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	15 (30,0)	7,50	0,006
		G2 selecionada com imazetapir	50	17 (34,0)	9,54	0,002
		G2 selecionada com mistura	49	40 (81,6)	48,86	<0,001
Setoxidim	92 (50%)	G0 (não selecionada)	50	5 (10,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	51	9 (17,6)	0,67	0,410
		G2 selecionada com imazetapir	42	12 (28,5)	4,06	0,040
		G2 selecionada com mistura	52	21 (40,3)	10,84	<0,001
Penoxsulam	48 (100%)	G0 (não selecionada)	50	50 (100,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	49	48 (97,9)	<0,001	0,990
		G2 selecionada com imazetapir	50	50 (100,0)	-	-
		G2 selecionada com mistura	50	48 (96,0)	0,51	0,470
Quincloraque	375 (100%)	G0 (não selecionada)	43	2 (4,6)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	41	27 (65,8)	32,12	<0,001
		G2 selecionada com imazetapir	40	3 (7,5)	0,007	0,93
		G2 selecionada com mistura	51	19 (37,2)	12,47	0,0004
Glifosato	185 (25%)	G0 (não selecionada)	40	16 (40,0)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	33 (66,0)	2,95	0,080
		G2 selecionada com imazetapir	50	27 (54,0)	1,22	0,260
		G2 selecionada com mistura	50	29 (58,0)	2,20	0,130
Paraquate	75 (25%)	G0 (não selecionada)	39	5 (12,8)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	50	0 (0,00)	4,58	0,032
		G2 selecionada com imazetapir	51	4 (7,8)	0,18	0,670
		G2 selecionada com mistura	50	0 (0,00)	4,58	0,032
Propanil	3600 (100%)	G0 (não selecionada)	46	33 (71,7)	-	-
		G2 selecionada com fenoxaprope	45	29 (64,4)	0,27	0,600
		G2 selecionada com imazetapir	47	31 (65,9)	0,14	0,700
		G2 selecionada com mistura	47	33 (70,2)	<0,001	0,990

*Valor p indica a probabilidade de rejeitar a hipótese nula (hipótese nula = sem diferença entre a geração G0 (parental) e as gerações G2 (G2 selecionada com fenoxaprope, imazetapir ou mistura). Plantas sobr.: plantas sobreviventes. Mistura: fenoxaprope + imazetapir.

Outra inferência sobre potencial para evolução da resistência múltipla foi encontrada para o herbicida glifosato no biótipo MOST (Tabela 10). As plantas da G2 selecionadas com fenoxaprope foram mais tolerantes ao glifosato, apresentando sobrevivência maior que 66% das plantas tratadas. De maneira menos pronunciada, a seleção de capim-arroz com imazetapir (32,6%) e mistura (18,7%) proporcionou maior sobrevivência ao glifosato em comparação com a geração G0 (0,0%) (Tabela 10). Por outro lado, a utilização de subdoses dos herbicidas nas seleções não contribuíram para o aumento da tolerância ao glifosato biótipo CAMAQ (Tabela 11). Este é o primeiro caso de que a seleção a partir de subdoses de fenoxaprope, imazetapir e a associação desses pode apresentar potencial para maior tolerância ao glifosato nas suas progênies. Outros trabalhos também estudaram possível evolução para a resistência ao glifosato através da seleção com subdoses de outros herbicidas. A seleção de plantas de *A. fatua* e *R. raphanistrum* com diclofope e dicamba não foi fator potencial para diminuir a sensibilidade ao glifosato nas progênies, respectivamente (Ashworth *et al.*, 2016; Busi *et al.*, 2016). Pelos resultados obtidos e os encontrados na literatura de não evolução da resistência para esse herbicida a partir de subdoses, a característica de maior tolerância ao glifosato do biótipo MOST adquirida nas progênies G2 selecionadas através de subdoses pode estar atrelada ao *background* genético da população do biótipo e não ao efeito dos herbicidas utilizados nas seleções.

De forma contrária com o ocorrido com o herbicida glifosato, as plantas da geração G2 dos biótipos MOST e CAMAQ selecionadas com os herbicidas foram mais sensíveis ao herbicida paraquate em relação à geração G0 (Tabela 10 e 11). Principalmente no biótipo MOST, o controle das gerações G2, independente do herbicida usado nas seleções, foi praticamente de 99% comparado com controle de 86% das plantas na G0 (Tabela 10). Deste modo, as plantas que apresentaram maior tolerância ao glifosato no biótipo MOST discutido acima foram mais suscetíveis ao paraquate, indicando que algum fator único possa estar controlando as duas características de forma oposta. A resistência a esses herbicidas de plantas daninhas ocorre principalmente devido à menor translocação (Hawkes, 2014; Sammons e Gaines, 2014). Outro mecanismo de resistência é o sequestro no vacúolo através de transportadores ABC de tonoplasto para o glifosato e transportadores de aminoácidos catiônicos para o paraquate (Peng *et al.*, 2010; Hawkes, 2014). Com base nos resultados, a seleção de capim-arroz com subdoses dos herbicidas, principalmente com fenoxaprope pode estar selecionando ou regulando para maior expressão de genes codificantes de transportadores ABC de tonoplasto e por outro lado regulando para menor expressão de transportadores de aminoácidos, tornando as plantas mais suscetíveis ao paraquate. No

entanto, maiores estudos nas próximas gerações de seleção deverão ser realizados para verificação e confirmação de tais efeitos.

A utilização de subdoses na seleções de plantas têm potencial para evolução da resistência por metabolização (Neve e Powles, 2005b). Essa prática também tem demonstrado ser potencial para a rápida evolução da resistência cruzada ou múltipla (Busi *et al.*, 2016). Os dados obtidos no trabalho (Figura 14 e 15) (Tabela 10, 11) demonstram que isto pode ocorrer também na espécie *E. crus-galli*. Os resultados indicam que a prática da mistura tem potencial não somente para evoluir para resistência aos herbicidas que compõem a mistura, como também para outros mecanismos de ação não usados nas seleções. A utilização da aplicação de mistura para controlar planta daninha resistente a um dos componentes em associação é potencial ainda maior para evolução da resistência a outros mecanismos de ação, como visto para o biótipo CAMAQ (Tabela 11). Esse biótipo é resistente aos herbicidas inibidores da ALS devido à capacidade de metabolizar os herbicidas através da participação de enzimas P450. O maior potencial para evolução da resistência a outros herbicidas no biótipo CAMAQ, em comparação ao MOST, se deve possivelmente a grande atividade dessas enzimas. Biótipos de plantas daninhas resistente por metabolização estão mais propensos a evoluir para a resistência a outros herbicidas e, por isso, a prática da utilização da mistura nesses casos deve ser melhor manejada. Os resultados presentes reafirmam a importância de utilização da dose recomendada para o controle de plantas daninhas e da aplicação em condições ambientais que proporcionem que a dose aplicada seja interceptada e absorvida pelas plantas. Somado a isso, um melhor estudo da interação dos herbicidas que serão utilizados na associação para controlar a resistência deve ser tomado para que não ocorra potencial ainda maior para evolução da resistência cruzada ou múltipla por metabolização.

4.3.5.1 Caracterização da evolução da resistência cruzada e múltipla por metabolização avaliada através de inibidor de enzimas P450

A partir dos resultados obtidos no experimento da caracterização do potencial para evolução da resistência cruzada ou múltipla, novo experimento foi realizado para verificar se a maior sobrevivência das plantas da G2 selecionadas é causada pelo incremento de metabolização por enzimas P450. Para tanto, os herbicidas quincloraque e diclofope foram escolhidos para realizar experimento de caracterização da evolução da resistência através de inibidor de enzima P450 em ambos biótipos de capim-arroz.

4.3.5.1.1 Avaliação da evolução da resistência ao quincloraque através de inibidor de P450.

A interação tripla entre os fatores geração, inibidor e doses do herbicida foi significativa para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea para ambos os biótipos MOST e CAMAQ (Apêndice 11). O controle das plantas da G2 selecionadas do biótipo MOST foi maior nas doses mais baixas e menor nas doses mais altas do herbicida quincloraque em relação a G0, principalmente nas plantas das gerações G2 selecionadas com fenoxaprope e com mistura (Figura 16A). Sem a aplicação prévia de malathion, os FRs para C₅₀ e GR₅₀ não diferiram da G0 (Tabela 12). A aplicação do inibidor de P450 malathion proporcionou maior controle das plantas, diminuindo significativamente os valores de C₅₀ e GR₅₀ das gerações G2 selecionadas (Tabela 12). No entanto, esse efeito também ocorreu para as plantas da geração G0 (Tabela 12).

As plantas das gerações G2 selecionadas tanto com fenoxaprope quanto com mistura do biótipo CAMAQ apresentaram maior tolerância ao quincloraque em relação à G0 (Figura 17A e C). O controle das plantas selecionadas com imazetapir foi similar ao controle das plantas da geração G0, ou seja, foram suscetíveis ao herbicida quincloraque (Figura 17A e C). As plantas da G2 selecionadas com fenoxaprope e mistura apresentaram C₅₀ de 165,9 e 121,6 g ha⁻¹ de quincloraque, respectivamente, comparada com 34,6 g ha⁻¹ da geração G0. Esses resultados proporcionaram um FR alto e significativo de 4,8 e 3,5, respectivamente (Tabela 13). A variável massa fresca da parte aérea apresentou resultados similares (Tabela 113). Os valores de FR foram aumentados para 7,1 e 6,8 com base nesta variável para a G2 selecionada com fenoxaprope e mistura, respectivamente (Tabela 13). A aplicação prévia do inibidor malathion resultou em maior controle pelo herbicida quincloraque das plantas da G2 selecionadas com fenoxaprope e mistura (Tabela 13). Os valores de FRs com base no C₅₀ diminuíram de 4,8 para 1,7 e de 3,5 para 1,7, respectivamente para G2 selecionada com fenoxaprope e G2 selecionada com mistura (Tabela 13). Não foi verificado efeito da aplicação prévia do malathion no controle das plantas da geração G0 do biótipo CAMAQ (Tabela 13).

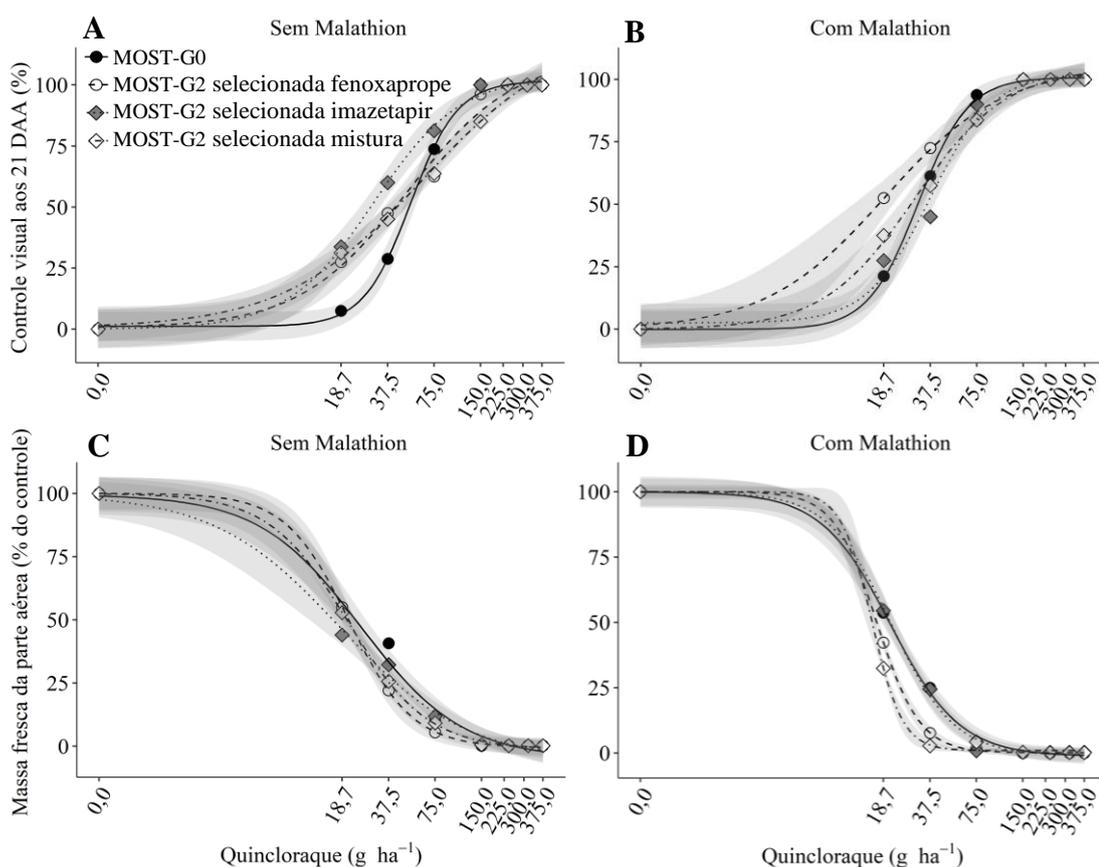


FIGURA 16. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida quinclorac sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Os resultados deste experimento corroboram os encontrados no experimento anterior de avaliação da evolução da resistência a outros herbicidas (Tabela 10 e 11). A evolução para resistência múltipla ao quinclorac ocorrida no biótipo CAMAQ é possivelmente devido ao incremento de metabolização, embora outra regulação também pode ter sido causada pelas gerações de seleção com os herbicidas fenoxaprop e fenoxaprop + imazetapir. Vários casos de resistência múltipla ao herbicida quinclorac foram relatados em biótipos de capim-arroz (Matzenbacher *et al.*, 2015a; Wright *et al.*, 2018; Heap, 2019) e os resultados do presente estudo podem ajudar a explicar como pode ter sido iniciada a evolução da resistência múltipla nas lavouras, principalmente quando do uso de misturas de herbicidas em subdoses para o manejo da resistência.

TABELA 12. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de quincloraque com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-2,8	1,2	101,7	52,7	±6,27	-
	com	-2,7	0,3	100,8	31,3	±3,93	0,6*
G2 selecionada com fenoxaprop	sem	-1,2	0,5	112,3	50,5	±5,23	0,95
	com	-1,1	0,1	105,2	18,9	±3,50	0,35*
G2 selecionada com imazetapir	sem	-1,6	0,1	103,8	30,6	±6,30	0,6*
	com	-2,1	2,5	102,8	37,5	±6,30	0,7*
G2 selecionada com mistura	sem	-0,9	0,4	122,2	63,5	±27,50	1,20
	com	-1,4	0,5	104,7	30,0	±6,20	0,6*
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	1,3	-4,9	99,6	24,7	±3,93	-
	com	1,9	-1,2	99,9	20,8	±2,42	0,80
G2 selecionada com fenoxaprop	sem	2,1	-0,5	99,9	20,7	±2,80	0,80
	com	3,1	0,1	100,0	16,9	±1,20	0,7*
G2 selecionada com imazetapir	sem	1,1	-6,1	99,8	18,3	±4,60	0,70
	com	2,1	-0,9	99,8	20,9	±0,80	0,80
G2 selecionada com mistura	sem	1,7	-1,3	99,9	20,4	±3,30	0,80
	com	4,3	0,9	100,0	15,7	±2,30	0,6*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas a aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com quincloraque sem aplicação prévia do inibidor. Mistura: fenoxaprop + imazetapir. * p<0,05 pelo teste F.

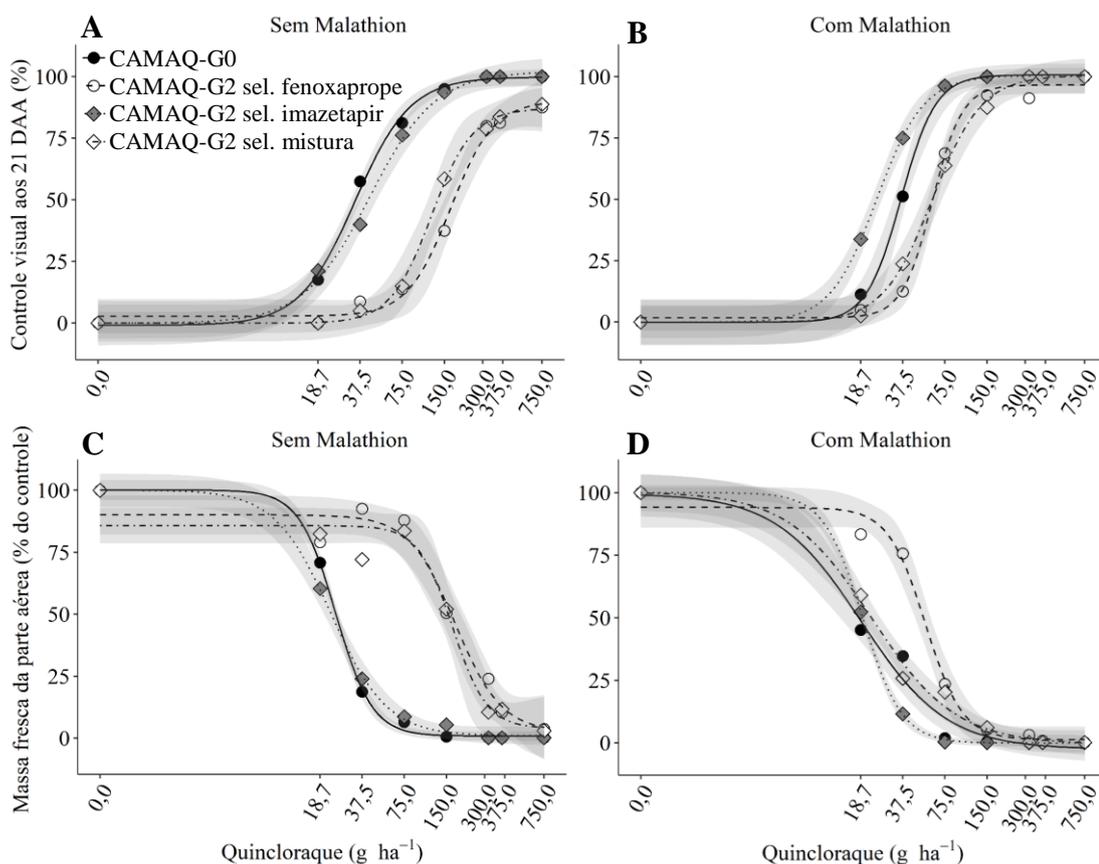


FIGURA 17. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprop, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo CAMAQ em relação à aplicação do herbicida quinclorac sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Embora o mecanismo de ação do quinclorac ainda não esteja bem esclarecido, alguns estudos tentam elucidar o que pode estar causando a resistência a esse herbicida nas plantas daninhas. Alguns trabalhos citam que a maior expressão de *GST* e kinases, até mesmo mutações em genes do citocromo P450, podem estar causando a maior detoxificação dos produtos gerados após aplicação de quinclorac, conferindo resistência múltipla em plantas daninhas (Wright *et al.*, 2018). A enzima beta-cianoalanina sintetase (β -CAS) é responsável pela degradação de cianeto, produto gerado nas plantas após aplicação do quinclorac, e a sua maior atividade, devido a uma mutação de ponto no DNA do gene *EcCAS*, foi identificada como sendo responsável pela resistência ao quinclorac em *E. crus-galli* (Gao *et al.*, 2017). A menor expressão dos genes *EcACS-like*, *EcACS7* e *EcACOI*, responsáveis pela biossíntese de etileno, são outros candidatos na resistência de capim-arroz ao quinclorac (Gao *et al.*, 2018). Mais recentemente, nova hipótese é que a menor expressão de genes relacionados ao fotossistema seja a principal causa de morte das plantas de capim-arroz ao quinclorac (Gao *et al.*, 2019). Assim, a resistência ao quinclorac é

obtida pela capacidade das plantas daninhas em manter ou aumentar a expressão desses genes após a aplicação do herbicida, prevenindo a planta dos danos causados (Gao *et al.*, 2019).

TABELA 13. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo CAMAQ submetidas às diferentes doses de quincloraque com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-2,2	-0,9	99,7	34,6	±6,0	
	com	-3,7	1,5	100,6	36,9	±4,2	1,1
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	-2,8	2,8	90,1	165,9	±27,9	4,8*
	com	-4,1	1,9	96,6	60,9	±7,1	1,7*
G2 selecionada com imazetapir	sem	-1,8	0,62	102,1	44,1	±8,7	1,2
	com	-2,6	0,1	100,4	24,5	±3,6	0,7*
G2 selecionada com mistura	sem	-3,0	0,4	86,9	121,6	±19,3	3,5*
	com	-2,3	-1,5	100,6	60,2	±9,3	1,7*
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	3,2	0,9	100,1	24,2	±3,0	
	com	1,4	-2,5	99,6	18,9	±4,7	0,8
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	2,6	2,5	90,0	173,3	±34,4	7,1*
	com	3,3	1,3	94,0	54,3	±7,2	2,2*
G2 selecionada com imazetapir	sem	2,1	0,9	100,1	22,3	±3,6	0,9
	com	3,1	-0,1	99,9	19,3	±2,4	0,8
G2 selecionada com mistura	sem	3,5	3,9	85,7	165,9	±24,9	6,8*
	com	1,4	-0,4	100,3	22,4	±5,0	0,9

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas a aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com quincloraque sem aplicação prévia do inibidor. Mistura: fenoxaprope + imazetapir. * p<0,05 pelo teste F.

Igualmente aos resultados obtidos no presente estudo, o uso de malathion também reverteu a resistência ao quincloraque em biótipos de *E. phyllopogon* (Yasuor *et al.*, 2012). A aplicação de malathion reduziu a atividade da enzima β -CAS em até 40%, diminuindo significativamente a degradação de cianeto, tornando a planta resistente mais suscetível ao quincloraque (Yasuor *et al.*, 2012). Com base nos resultados obtidos, a seleção de biótipos de capim-arroz através de subdoses de fenoxaprope e mistura de fenoxaprope + imazetapir

possivelmente promoveram alteração para maior atividade da enzima β -CAS, a qual permite maior detoxificação de cianeto. Essa regulação se confirma pela reversão dos FRs com a aplicação prévia de malathion (Tabela 13). No entanto, outras alterações podem ter proporcionado a maior tolerância e estudos posteriores deverão ser realizados para confirmação ou não de tais efeitos.

4.3.5.1.2 Avaliação da evolução da resistência ao herbicida diclofope através de inibidor de P450.

A interação tripla para os fatores geração, inibidor e doses do herbicida foi significativa para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea para ambos os biótipos MOST e CAMAQ (Apêndice 11). As plantas da geração G2 do biótipo MOST selecionadas com mistura apresentaram maior tolerância à aplicação do herbicida diclofope (Figura 18A e C). Os valores de C_{50} (156,8 g ha⁻¹) e GR_{50} (141,1 g ha⁻¹) dessas plantas foram significativamente superiores aos encontrados para as plantas da geração G0 (91,2 e 77,8g), resultando nos FRs de 1,7 e 1,8, respectivamente para as variáveis controle aos 21 DAA e massa fresca (Tabela 14). A aplicação prévia do malathion reverteu a resistência das plantas selecionadas com a mistura, reduzindo o C_{50} e GR_{50} para valores de 54,1 e 52,2 g ha⁻¹ de quincloraque (Tabela 14). Para o biótipo CAMAQ, as plantas da geração G2 selecionadas com fenoxaprope foram as mais tolerantes (Figura 18A e C). Essas plantas apresentaram FRs de 2,0 e 1,7, para as variáveis controle aos 21DAA e massa fresca da parte aérea (Tabela 15) e a aplicação prévia de malathion causou redução significativa dos FRs, igualando-os estatisticamente aos valores obtidos pelas plantas da geração G0 (Tabela 15).

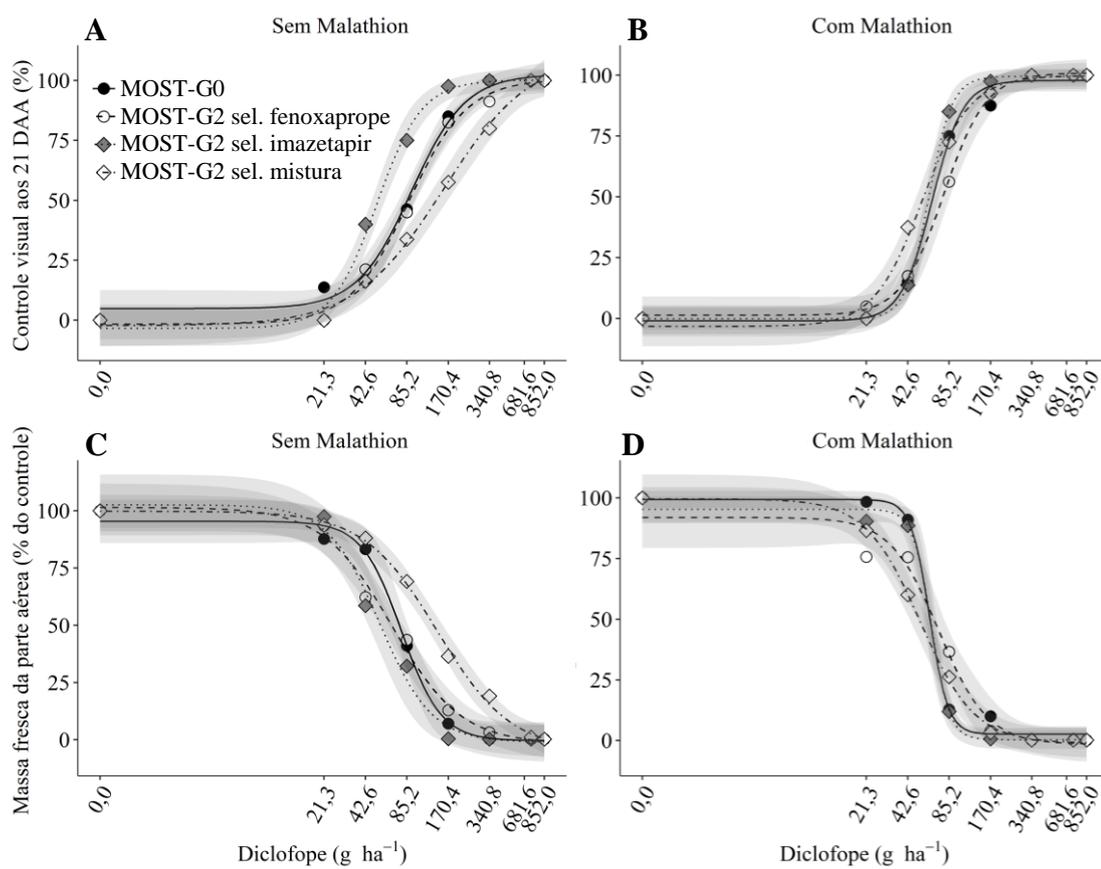


FIGURA 18. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo MOST em relação à aplicação do herbicida diclofope sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

A resistência ao herbicida diclofope foi relatado recentemente em biótipos de capim-arroz ocasionada pelo incremento de metabolização (Iwakami *et al.*, 2019). Esse herbicida quando entra na célula é convertido para diclofope ácido e nessa forma pode ser inativado por hidroxilação, principalmente por enzimas do citocromo P450 (Zimmerlin e Durst, 1990; Jeschke, 2016). Enzimas da família CYP81, como CYP81A12 e CYP81A21, foram indicadas como sendo responsáveis pela metabolização de diclofope e outros herbicidas em capim-arroz com resistência múltipla (Iwakami *et al.*, 2019). Possivelmente a maior tolerância ao diclofope encontrada pelas plantas de capim-arroz das gerações G2 selecionadas com mistura no biótipo MOST e fenoxaprope no biótipo CAMAQ se deve à maior metabolização por enzimas detoxificantes. O herbicida fenoxaprope usado nas seleções das plantas de capim-arroz pertence ao mesmo grupo químico do diclofope e, portanto, o potencial da evolução que ocorreu para a maior metabolização de fenoxaprope, ocorreu também para diclofope. No entanto, o uso de subdoses da mistura de fenoxaprope

com imazetapir na seleção de plantas do biótipo MOST potencializou a maior detoxificação de diclofope nas plantas da G2 selecionadas (Tabela 14 e Figura 17). Os resultados corroboram os da literatura de que a mistura de herbicidas em subdoses pode potencializar a evolução para a resistência a outros herbicidas (Lagator *et al.*, 2013). De modo geral, os resultados deste experimento confirmam os encontrados no experimento anterior de sobrevivência, indicando que o uso da mistura apresenta potencial para evolução da resistência a outros herbicidas.

TABELA 14. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo MOST submetidas às diferentes doses de diclofope com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-2,1	4,2	102,6	91,2	±15,3	-
	com	-3,8	-1,2	97,8	63,8	±6,8	0,7*
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	-2,0	-1,7	100,5	87,7	±14,8	0,9
	com	-2,8	1,4	100,9	77,9	±9,9	0,8
G2 selecionada com imazetapir	sem	-2,6	-3,6	100,2	51,3	±7,0	0,5*
	com	-5,1	-0,3	99,5	60,5	±6,5	0,6*
G2 selecionada com mistura	sem	-1,3	-2,5	111,6	156,8	±49,3	1,7*
	com	-2,4	-3,2	99,7	54,1	±7,5	0,6*
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	2,9	-0,5	95,4	77,8	±13,6	-
	com	6,4	2,6	99,3	61,4	±8,3	0,8
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	1,7	-2,1	101,5	66,4	±17,7	0,8
	com	2,4	-1,6	91,9	71,7	±13,1	0,9
G2 selecionada com imazetapir	sem	2,3	-1,0	102,6	54,1	±11,3	0,6*
	com	6,5	0,3	95,3	63,1	±9,0	0,8
G2 selecionada com mistura	sem	1,6	-4,5	99,6	141,1	±45,1	1,8*
	com	2,2	-1,1	99,6	52,2	±8,9	0,6*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas a aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com diclofope sem aplicação prévia do inibidor. Mistura: fenoxaprope + imazetapir. *p<0,05 pelo teste F.

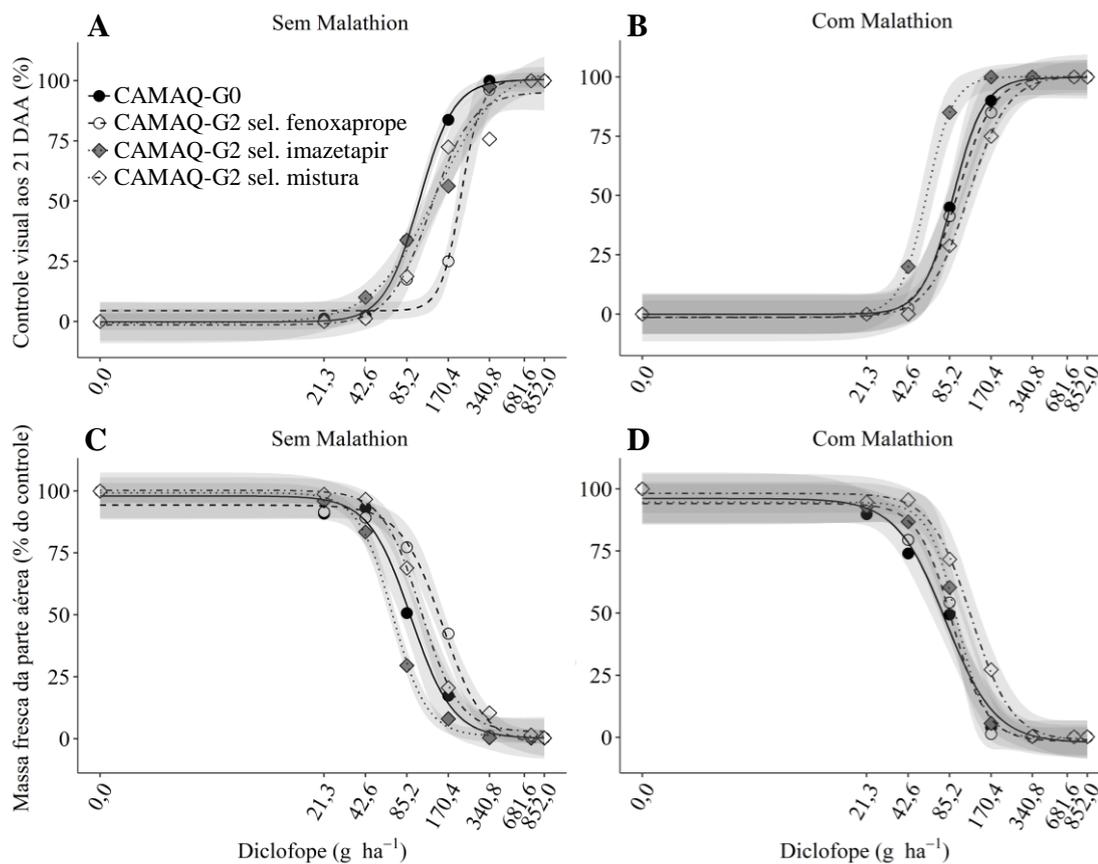


FIGURA 19. Controle visual aos 21 DAA (%) (A e B) e massa fresca da parte aérea (% do controle) (C e D) das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, G2 selecionada com subdoses de imazetapir e G2 selecionada com subdoses de mistura do biótipo CAMAQ em relação a aplicação do herbicida diclofopose sem (A e C) ou com (B e D) a aplicação de 1000g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

TABELA 15. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual aos 21 DAA e massa fresca da parte aérea das plantas de capim-arroz das gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir, G2 selecionada com mistura do biótipo CAMAQ submetidas às diferentes doses de diclofope com ou sem a aplicação de 1000 g ha⁻¹ do inibidor malathion duas horas antes da aplicação do herbicida.

Geração	Malathion (1000 g ha ⁻¹)	b	c	d	C ₅₀ ou GR ₅₀		FR
					Dose (g ha ⁻¹)	IC	
-----controle visual aos 21 DAA-----							
G0 não selecionada	sem	-3,4	-0,2	100,5	104,6	±14,6	-
	com	-3,7	-1,0	99,8	90,1	±11,0	0,8
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	-5,8	4,4	100,5	210,9	±31,1	2,0*
	com	-3,2	-1,3	100,2	95,8	±13,4	0,9
G2 selecionada com imazetapir	sem	-1,9	-0,6	105,7	137,7	±30,1	1,3
	com	-4,4	-0,5	100,2	57,8	±7,7	0,5*
G2 selecionada com mistura	sem	-2,9	-1,4	95,4	127,00	±22,0	1,2
	com	-3,0	-1,4	100,5	116,2	±17,7	1,1
-----massa fresca da parte aérea-----							
G0 não selecionada	sem	2,8	0,1	97,9	91,1	±14,0	-
	com	2,4	-2,3	96,1	79,7	±15,2	0,8
G2 selecionada com fenoxaprope	sem	2,8	-2,5	94,3	154,6	±24,4	1,7*
	com	3,4	-1,5	94,0	89,2	±13,0	0,9
G2 selecionada com imazetapir	sem	3,4	0,9	99,3	66,9	±9,1	0,7*
	com	4,1	-0,4	94,5	96,3	±11,1	1,1
G2 selecionada com mistura	sem	3,1	2,6	100,3	108,2	±15,8	1,1
	com	2,9	-1,2	98,1	122,3	±18,5	1,3*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; C₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável massa fresca da parte aérea; IC: intervalo de confiança do parâmetro C₅₀ ou GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = C₅₀ ou GR₅₀ das gerações G2 submetidas a aplicação dos tratamentos/C₅₀ ou GR₅₀ da geração G0 tratada com diclofope sem aplicação prévia do inibidor. Mistura: fenoxaprope + imazetapir. * p<0,05 pelo teste F.

4.4 Conclusões

A utilização de subdoses da mistura de fenoxaprope + imazetapir na seleção de plantas de capim-arroz por duas gerações resultou em aumento na tolerância a esses herbicidas e apresenta potencial para evolução da resistência aos herbicidas cialofope, clodinafope, setoxidim, glifosato e, principalmente, aos herbicidas diclofope e quincloraque. O biótipo CAMAQ foi mais propenso à evolução da resistência aos outros herbicidas.

A utilização de subdoses do herbicida fenoxaprope na seleção de capim-arroz proporcionou maior tolerância após duas gerações de seleção do que o herbicida imazetapir. Quando em mistura, o herbicida fenoxaprope pode ser responsável pelo aumento da

tolerância aos herbicidas, uma vez que as plantas selecionadas com subdoses de imazetapir não apresentaram diminuição da sensibilidade.

O aumento da tolerância aos herbicidas quincloraque e diclofope foi ocasionada pelo incremento de metabolização, principalmente pelas enzimas do citocromo P450, pela reversão do FR quando aplicado inibidor dessas enzimas.

O uso da mistura de herbicidas fenoxaprop e imazetapir em subdoses pode favorecer a evolução da resistência a outros herbicidas, principalmente quando a resistência for associada ao incremento de metabolização.

4.5 Referências bibliográficas

- ABENDROTH, J. A. *et al.* Joint action analysis utilizing concentration addition and independent action models. **Weed Technology**, Champaign, v. 25, n. 3, p. 436-446, 2011.
- ALTENBURGER, R. *et al.* Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals - combination effect studies with pesticides in algal biotests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Plymouth, v. 20, n. 1, p. 98-114, 1990.
- ASHWORTH, M. B. *et al.* Recurrent selection with reduced 2,4-D amine doses results in the rapid evolution of 2,4-D herbicide resistance in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 11, p. 2091-2098, 2016.
- BAJWA, A. A. *et al.* Eco-biology and management of *Echinochloa crus-galli*. **Crop Protection**, Guildford, v. 75, p. 151-162, 2015.
- BAKKALI, Y. *et al.* Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): Mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 10, p. 4052-4058, 2007.
- BECKIE, H. J.; HARKER, K. N. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 6, p. 1045-1052, 2017.
- BECKIE, H. J.; REBOUD, X. Selecting for weed resistance: herbicide rotation and mixture. **Weed Technology**, Champaign, v. 23, n. 3, p. 363-370, 2009.
- BUSI, R.; GAINES, T. A.; POWLES, S. Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 2, p. 410-417, 2017.
- BUSI, R.; GIROTTO, M.; POWLES, S. B. Response to low-dose herbicide selection in self-pollinated *Avena fatua*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 3, p. 603-608, 2016.
- BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 6, n. 2, p. 231-242, 2013.

- BUSI, R.; POWLES, S. B. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. **Heredity**, London, v. 103, n. 4, p. 318-325, 2009.
- BUSI, R.; POWLES, S. Inheritance of 2,4-D resistance traits in multiple herbicide-resistant *Raphanus raphanistrum* populations. **Plant Science**, Shannon, v. 257, p. 1-8, Apr 2017.
- COLBY, S. R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. **Weeds**, Ithaca, v. 15, n. 1, p. 20-37, 1967.
- DALAZEN, G. *et al.* Degradation enhancement as the mechanism of resistance to imazethapyr in barnyardgrass. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 36, p. 1-13, 2018a.
- DALAZEN, G. MARKUS, C. MEROTTO JR, A. Differential expression of genes associated with degradation enhancement of imazethapyr in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 10, n. 9, p. 389-401, 2018b.
- DELLAFERRERA, I. *et al.* First Report of *Amaranthus hybridus* with Multiple Resistance to 2,4-D, Dicamba, and Glyphosate. **Agronomy**, Basel, v. 8, n. 8, p. 8, 2018.
- DELYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forth coming decade. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2013.
- GAO, Y. *et al.* Is the protection of photosynthesis related to the mechanism of quinclorac resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*? **Gene**, Amsterdam, v. 683, p. 133-148, 2019.
- GAO, Y. *et al.* Quinclorac resistance induced by the suppression of the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase genes in *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 146, p. 25-32, 2018.
- GAO, Y. *et al.* Resistance to quinclorac caused by the enhanced ability to detoxify cyanide and its molecular mechanism in *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 143, p. 231-238, 2017.
- GARCIA, M. D. *et al.* Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. **PNAS**, Washington, DC, v. 114, n. 7, p. 1091-1100, 2017.
- GAZZIERO, D. L. P. Mixtures of pesticides in tank, in brazilian farms. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 83-92, 2015.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 36, n. 1, p. 24-34, 2017a.
- GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C. Perspectives on non-target site mechanisms of herbicide resistance in weedy plant species using evolutionary physiology. **Aob Plants**, Oxford, v. 9, p. 5, 2017b.

- GUO, L. B. *et al.* *Echinochloa crus-galli* genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed. **Nature Communications**, London, v. 8, p. 10, 2017.
- HAWKES, T. R. Mechanisms of resistance to paraquat in plants. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 9, p. 1316-1323, 2014.
- HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. [2019]. Disponível em <<http://www.weedscience.com>> Acesso em: 10 de março de 2019.
- IWAKAMI, S. *et al.* CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. **New Phytologist**, London, v. 221, n. 4, p. 2112-2122, 2019.
- IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 *CYP81A12* and *CYP81A21* are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 165, n. 2, p. 618-629, 2014a.
- IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 genes induced by bispyribac- sodium treatment in a multiple- herbicide- resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 4, p. 549-558, 2014b.
- IWAKAMI, S. *et al.* Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 119, p. 1-8, 2015.
- IWAKAMI, S. Towards the understanding of mechanism of multiple-herbicide resistance in *Echinochloa phyllopogon*. **Japanese Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 43, n. 1, p. 40-45, 2018.
- JESCHKE, P. Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 3, p. 433-455, 2016.
- KORBIE, D. J.; MATTICK, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1452-1456, 2008.
- KRAEHMER, H. *et al.* Global distribution of rice weeds A review. **Crop Protection**, Guildford, v. 80, p. 73-86, 2016.
- LAGATOR, M. *et al.* Herbicide mixtures at high doses slow the evolution of resistance in experimentally evolving populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. **New Phytologist**, London, v. 198, n. 3, p. 938-945, 2013.
- LU, H. P. *et al.* Expression of cytochrome P450 *CYP81A6* in rice: tissue specificity, protein subcellular localization, and response to herbicide application. **Journal of Zhejiang University-Science B**, Zhejiang, v. 16, n. 2, p. 113-122, 2015.
- MATZENBACHER, F. O. *et al.* Antagonism is the predominant effect of herbicide mixtures used for imidazolinone-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 587-597, 2015b.

MATZENBACHER, F. O. *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 153, n. 6, p. 1044-1058, 2015a.

MATZRAFI, M. *et al.* Evolution of herbicide resistance mechanisms in grass weeds. **Plant Science**, Shannon, v. 229, p. 43-52, 2014.

NANDULA, V. K. *et al.* Herbicide metabolism: crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. **Weed Science**, Champaign, v. 67, n. 2, p. 149-175, 2019.

NEVE, P.; POWLES, S. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. **Heredity**, London, v. 95, n. 6, p. 485-492, Dec 2005a.

NEVE, P.; POWLES, S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n. 6, p. 1154-1166, Apr 2005b.

NORSWORTHY, J. K. *et al.* Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, Champaign, v. 60, p. 31-62, 2012.

PENG, Y. H. *et al.* Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 66, n. 10, p. 1053-1062, 2010.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.317-347, 2010.

R Core Team. **R version 3.3.3**: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: URL <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 4 jan. 2019.

RIAR, D. S. *et al.* Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 61, n. 2, p. 278-289, 2013.

RISSEL, D.; ULBER, L. Selection for reduced iodosulfuron sensitivity in *Apera spica-venti*. **Julius-Kühn-Archiv**, Quedlinburg, v. 458, p. 94-98, 2018. Trabalho apresentado no 28th German Conference on Weed Biology and Weed Control, em Braunschweig, Germany, 27 February-1 March, 2018.

RITZ, C. *et al.* Dose-response analysis using R. **Plos One**, São Francisco, v. 10, n. 12, p. 13, 2015.

ROUSE, C. E. *et al.* Echinochloa resistance to herbicides continues to increase in Arkansas rice fields. **Weed Technology**, Champaign, v. 32, n. 1, p. 34-44, 2018.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.

SOBYE, K. W.; STREIBIG, J. C.; CEDERGREEN, N. Prediction of joint herbicide action by biomass and chlorophyll a fluorescence. **Weed Research**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 23-32, 2011.

SONG, J. S. *et al.* Cross-resistance of *Echinochloa* species to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Weed Biology and Management**, Carlton, v. 17, n. 2, p. 91-102, 2017.

TEHRANCHIAN, P. *et al.* Recurrent sublethal-dose selection for reduced susceptibility of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to dicamba. **Weed Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 206-212, 2017.

TEHRANCHIAN, P. *et al.* The expression of detoxification genes in two maize cultivars by interaction of isoxadifen-ethyl and nicosulfuron. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 129, p. 101-108, 2018.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. **Journal of Ecology**, London, v. 97, n. 4, p. 772-780, 2009.

WICKHAM, H. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag, 2016. 211p.

WRIGHT, A. A. *et al.* Characterization of Fenoxaprop-P-Ethyl-Resistant Junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaign, v. 64, n. 4, p. 588-595, 2016.

WRIGHT, A. A. *et al.* Multiple herbicide-resistant junglerice (*Echinochloa colona*): identification of genes potentially involved in resistance through differential gene expression analysis. **Weed Science**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 347-354, 2018.

YASUOR, H. *et al.* Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 1, p. 108-115, 2012.

YU, Q.; POWLES, S. Enhanced rates of herbicide metabolism in low herbicide-dose selected resistant *Lolium rigidum*. **Plant Cell and Environment**, London, v. 36, n. 4, p. 818-827, 2013.

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 3, p. 1106-1118, 2014.

YUN, M. S. *et al.* Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 83, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

ZHANG, J. H.; HAMILL, A. S.; WEAVER, S. E. Antagonism and synergism between herbicides - trends from previous studies. **Weed Technology**, Champaign, v. 9, n. 1, p. 86-90, 1995.

ZHOU, Q. *et al.* Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 89, n. 2, p. 89-96, 2007.

ZIMMERLIN, A.; DURST, F. Xenobiotic metabolism in plants - aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome-p-450 enzyme from wheat. **Phytochemistry**, London, v. 29, n. 6, p. 1729-1732, 1990.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Populações de capim-arroz resistentes aos herbicidas são frequentemente encontradas em lavouras de arroz em todo o mundo. O principal mecanismo de resistência em capim-arroz é a maior capacidade de metabolização dos herbicidas. Essa característica adquirida é preocupante devido à resistência múltipla, e os fatores envolvidos nestes processos são pouco entendidos. Os resultados deste trabalho indicam que o uso de protetor isoxadifen e o uso da mistura dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir apresentam potencial para o aumento da tolerância nas progênies nos biótipos estudados, evidenciando processos iniciais para evolução da resistência a esses herbicidas.

O protetor isoxadifen associado ao herbicida fenoxaprope aumenta o FR das plantas da G2 selecionadas, proporcionando maior sobrevivência em relação às subdoses do herbicida fenoxaprope. O uso de subdoses do herbicida fenoxaprope associado ou não ao protetor isoxadifen na seleção de plantas de capim-arroz apresenta potencial para a evolução da resistência a esse herbicida. As plantas da geração G2 selecionadas tanto com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen demonstraram maior tolerância em relação à G0 aos herbicidas clodinafope, glifosato e, principalmente, ao cialofope e quincloraque. Esses resultados indicam que a seleção de plantas de capim-arroz com subdoses de fenoxaprope apresenta potencial para evoluir a resistência aos outros herbicidas. O mecanismo de resistência envolvido na maior tolerância provavelmente é a maior metabolização por enzimas P450.

A mistura dos herbicidas fenoxaprope e imazetapir na seleção de plantas de capim-arroz proporcionou aumento na sobrevivência nas gerações e também aumento do FR de ambos os biótipos avaliados, indicando maior tolerância nas plantas da geração G2. A mistura destes herbicidas também aumentou a tolerância ao cialofope, setoxidim, glifosato e, principalmente, diclofope e quincloraque, mostrando ser potencial para evolução da resistência múltipla a estes compostos. Neste estudo, o biótipo CAMAQ, que possui resistência ao herbicida imazetapir causada por incremento de metabolização, apresentou

maiores tolerância aos outros herbicidas do que o biótipo suscetível MOST. A maior tolerância ao herbicida quincloraque e diclofope adquirida pelo biótipo CAMAQ e MOST é revertida por inibidor de metabolização. A característica da evolução para a resistência aos herbicidas de forma mais rápida no biótipo CAMAQ se deve, possivelmente, ao fato deste já possuir atributos genéticos para maior metabolização pela participação das enzimas citocromo P450.

A ocorrência da resistência aos herbicidas inibidores da ALS é muito comum em capim-arroz. As ferramentas químicas utilizadas para controlar estes biótipos são os herbicidas inibidores da ACCase, como fenoxaprope e cialofope, ou a mistura desses com os inibidores da ALS. Os resultados obtidos no trabalho demonstram que, caso a mistura não resulte em controle satisfatório do biótipo resistente e a resistência seja por metabolização, a mistura utilizada tem potencial para proporcionar aumento da tolerância nas progênes e até mesmo evoluir para a resistência a outros herbicidas. Esses resultados corroboram o grande número de biótipos de capim-arroz identificados com resistência múltipla e, auxiliam no entendimento da contribuição dessa prática na evolução da resistência.

Os resultados deste estudo indicam de forma pioneira que os efeitos de protetor e da mistura de herbicidas podem contribuir para o aumento da resistência aos herbicidas. Estes resultados evidenciam a grande complexidade da resistência aos herbicidas em plantas daninhas e indicam a necessidade de estudos mais específicos sobre a interação de herbicidas nas plantas e, principalmente, para a adoção de estratégias não relacionadas exclusivamente ao uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas.

6 APÊNDICES

Capítulo I

APÊNDICE 1. Comandos do software R usados para análise estatísticas e montagem dos gráficos.

```
library(drc)  
library(ExpDes.pt)  
attach(dados)
```

#dic TRIFATORIAL

```
fat3.dic(fat1, fat2, fat3, variável,  
        quali = c(TRUE, FALSE, TRUE),  
        mcomp = "tukey",  
        fac.names = c("biotipos", "Dose", "Malation"),  
        sigT = 0.05,  
        sigF = 0.05)
```

#dic FATORIAL

```
fat2.dic(fat1, fat2, variável,  
        quali = c(TRUE, FALSE),  
        mcomp = "tukey",  
        fac.names = c("biotipos", "Dose"),  
        sigT = 0.05,  
        sigF = 0.05)
```

#comando para log-logística de 4 parametros

```
resultado<-drm(variável~fat1, fat2, data = arquivo, fct = LL.4(names = c("Slope", "Lower  
limit", "Upper limit", "ED50")))
```

#verificar o ajuste do modelo

```
modelFit(resultados)
```

#leitura dos parâmetros e intervalo de confiança

```
summary(resultados)  
confint(resultados, level = 0.95, pool = FALSE)
```

#plotagem dos resíduos

continuação APÊNDICE 1. Comandos do software R usados para análise estatísticas e montagem dos gráficos.

```
plot(fitted(subdose), resid(subdose))
```

#verificação da distribuição da normalidade dos dados

```
qqnorm(resid(subdose))
```

#pedindo valores específicos de C50, C80, C90 com intervalo de confiança

```
ED(resultado, c(50, 80, 90), interval = "delta")
```

#comparação de C50 das curvas

```
EDcomp(subdose, c(50,50), reverse = TRUE)
```

```
EDcomp(subdose, c(50,50))
```

#comandos para montagem dos gráficos

```
library(Rmisc)
```

```
library(ggplot2)
```

```
summarySE(subdoses,measurevar = "variável", groupvars = c("fat1", "fat2"))
```

```
windowsFonts(Times=windowsFont("Times New Roman"))
```

```
saída <- ggplot(H, aes(x=doses, y = variável))+
```

```
  geom_point(aes(shape=biótipos, color=biotipos, fill=biotipos),
             size=c(3))+
```

```
  scale_shape_manual(name="HERBICIDA",
```

```
                    values=c(21, 21),
```

```
                    breaks=c("B", "A"),
```

```
                    labels=c("nome", "nome"))+
```

```
  scale_colour_manual(name="HERBICIDA",
```

```
                    values = c("black", "black"),
```

```
                    name="herbicida",
```

```
                    breaks=c("B", "A"),
```

```
                    labels=c("nome", "nome"))+
```

```
  scale_fill_manual(name="HERBICIDA",
```

```
                   values = c("black", "white"),
```

```
                   breaks=c("B", "A"),
```

```
                   labels=c("nome", "nome"))+
```

```
  coord_trans(x="log")+
```

```
  geom_line(data = arquivo1, aes(x=doses, y = p, linetype="nome1"), size=0.5)+
```

```
  geom_line(data = arquivo2, aes(x=doses, y = p, linetype="nome2"), size=0.5)+
```

```
  scale_linetype_manual(name="nomex",
```

```
                      values = c("nome1"="dashed", "nome2"="solid"))+
```

```
  geom_ribbon(data=arquivo1, aes(x=DOSE, y=p, ymin=pmin, ymax=pmax), alpha=0.1,
            fill="gray2")+
```

```
  geom_ribbon(data=arquivo2, aes(x=DOSE, y=p, ymin=pmin, ymax=pmax), alpha=0.2,
            fill="gray2")
```

#plotagem gráfico_alta_qualidade

```
ggsave("pasta/nome_do_arquivo.TIFF", units="in", width=5, height=4, dpi=600,
       compression = 'lzw')
```

#teste qui-quadrado

```
library(MASS)
```

```
head(arquivo)
```

continuação APÊNDICE 1. Comandos do software R usados para análise estatísticas e montagem dos gráficos.

#G0/G2 selecionada

prop.test(c(n. sobreviventes G0, n. sobrevivente G2),c(n. plantas tratadas G0, n. plantas tratadas G2))

conf.level = 0.95, correct = TRUE)

APÊNDICE 2. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta para a definição de subdoses para os biótipos MOST e CAMAQ para o herbicida fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Biótipo MOST

Variável controle 21 DAA após aplicação.

FV	GL	QM	F	p
Herbicida	1	156,1	15,09	<0,001
Dose	8	18500,6	1788,78	<0,001
Herbicida x Dose	8	146,9	14,20	<0,001
Resíduo	54	10,3		
CV = 6,68%				

Variável massa fresca da parte aérea, biótipo.

FV	GL	QM	F	p
Herbicida	1	21,3	0,93	0,34
Dose	8	16094,5	698,35	<0,001
Herbicida x Dose	8	59,5	2,58	0,01
Resíduo	54	23,0		
CV = 9,75%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Herbicida	1	14,8	0,68	0,41
Dose	8	15576,8	720,33	<0,001
Herbicida x Dose	8	81,9	3,79	0,001
Resíduo	54	21,6		
CV = 10,11%				

Biótipo CAMAQ

Variável controle 21 DAA após aplicação, biótipo

FV	GL	QM	F	p
Herbicida	1	60,5	3,71	0,059
Dose	8	17028,1	1043,13	<0,001
Herbicida x Dose	8	56,8	3,48	0,002
Resíduo	54	16,3		
CV = 8,14%				

continuação APÊNDICE 2. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta para a definição de subdoses para os biótipos MOST e CAMAQ para o herbicida fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Herbicida	1	1125,8	51,69	<0,001
Dose	8	13528,7	621,16	<0,001
Herbicida x Dose	8	257,7	11,83	<0,001
Resíduo	54	21,8		
CV = 11,54%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Herbicida	1	606,0	28,89	<0,001
Dose	8	14544,7	693,48	<0,001
Herbicida x Dose	8	93,5	4,46	<0,001
Resíduo	54	21,0		
CV = 10,53%				

APÊNDICE 3. Análise de variância do experimento de curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Biótipo MOST

Herbicida fenoxaprope

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1966,9	193,77	<0,001
Dose	8	26092,7	2570,49	<0,001
Dose x Geração	16	795,2	78,34	<0,001
Resíduo	81	10,2		
CV = 5,89%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1704,9	160,0	<0,001
Dose	8	23096,4	2167,54	<0,001
Dose x Geração	16	691,9	64,93	<0,001
Resíduo	81	10,7		
CV = 7,86%				

continuação APÊNDICE 3. Análise de variância do experimento de curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas com fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	2157,9	139,0	<0,001
Dose	8	21925,7	1419,44	<0,001
Dose x Geração	16	772,2	49,99	<0,001
Resíduo	81	15,4		
CV = 9,72%				

Herbicida fenoxaprope + isoxadifen

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	2401,9	316,6	<0,001
Dose	8	24883,6	3280,0	<0,001
Dose x Geração	16	1086,9	143,3	<0,001
Resíduo	81	7,6		
CV = 4,66%				

Variável da massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	665,5	51,80	<0,001
Dose	8	23555,6	1833,40	<0,001
Dose x Geração	16	630,3	49,06	<0,001
Resíduo	81	12,8		
CV = 9,06%				

Variável da massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	724,2	43,63	<0,001
Dose	8	23510,7	1416,46	<0,001
Dose x Geração	16	538,1	32,42	<0,001
Resíduo	81	16,6		
CV = 10,56%				

Biótipo CAMAQ

Herbicida fenoxaprope

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	2156,2	325,4	<0,001
Dose	8	26708,1	4030,5	<0,001
Dose x Geração	16	914,6	142,1	<0,001
Resíduo	81	6,6		
CV = 4,73%				

continuação APÊNDICE 3. Análise de variância do experimento de curvas de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle e G2 selecionadas com fenoxaprop e fenoxaprop + isoxadifen.

Variável massa fresca da parte aérea

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1831,0	139,58	<0,001
Dose	8	25279,8	1927,08	<0,001
Dose x Geração	16	731,9	55,79	<0,001
Resíduo	81	13,1		

CV = 8,3%

Variável massa seca da parte aérea

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1002,8	43,21	<0,001
Dose	8	24571,4	1058,76	<0,001
Dose x Geração	16	543,7	23,43	<0,001
Resíduo	81	23,2		

CV = 11,47%

Herbicida fenoxaprop + isoxadifen

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1329,2	186,8	<0,001
Dose	8	27940,9	3925,8	<0,001
Dose x Geração	16	831,1	116,8	<0,001
Resíduo	81	7,1		

CV = 4,97%

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	863,9	62,65	<0,001
Dose	8	25876,4	1876,65	<0,001
Dose x Geração	16	647,3	46,94	<0,001
Resíduo	81	13,8		

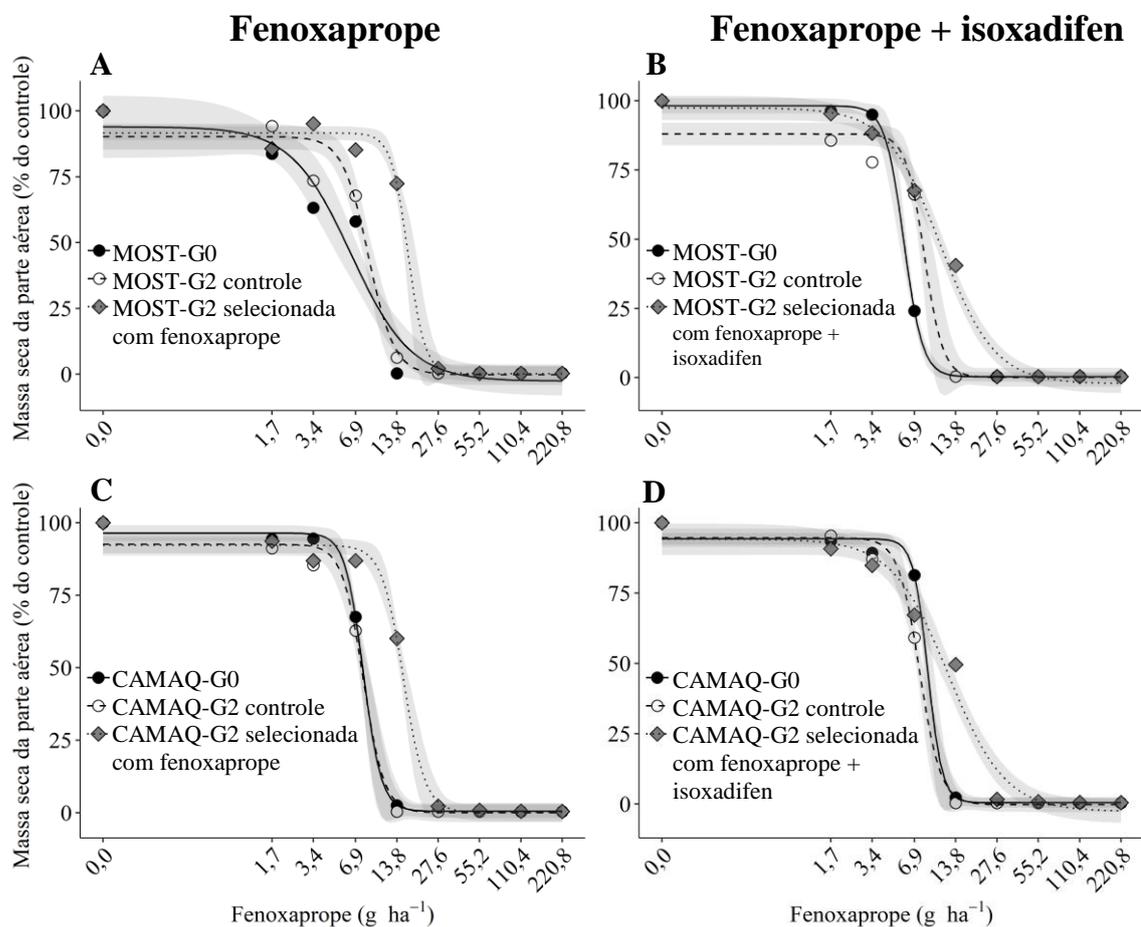
CV = 8,57%

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	307,8	25,20	<0,001
Dose	8	24324,0	1991,67	<0,001
Dose x Geração	16	418,8	34,29	<0,001
Resíduo	81	12,2		

CV = 11,24%

APÊNDICE 4. Massa seca da parte aérea (% do controle) das gerações de seleções dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ em relação à aplicação do herbicida fenoxaprope sem e com protetor isoxadifen e parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ.



FIGUTRA. Massa seca da parte aérea (% do controle) das gerações de seleções dos biótipos de capim-arroz MOST (A e B) e CAMAQ (C e D) em relação à aplicação do herbicida fenoxaprope (A e C) e fenoxaprope + isoxadifen (B e D).

continuação APÊNDICE 4. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0 (não selecionada), G2 controle (não selecionada) e G2 selecionadas, submetidas a diferentes doses de fenoxaprope e fenoxaprope + isoxadifen.

Biótipo	Geração	Herbicida aplicado	b	c	d	GR ₅₀		FR
						Dose (g ha ⁻¹)	IC	
MOST	G0	fenoxaprope	2,0	-2,6	93,9	6,4	1,4	-
	G2 controle		4,6	-0,2	90,2	8,5	0,8	1,3
	G2 selecionada com fenoxaprope		7,1	0,2	91,5	16,6	2,5	2,6*
	G0	fenoxaprope + isoxadifen	6,4	0,3	98,2	5,8	0,6	-
	G2 controle		7,7	0,1	87,9	8,0	1,1	1,4
	G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen		2,2	-2,2	97,4	10,7	1,6	1,9*
CAMAQ	G0	fenoxaprope	6,6	0,5	96,4	7,8	0,7	-
	G2 controle		6,7	0,0	92,4	7,7	0,6	0,9
	G2 selecionada com fenoxaprope		5,5	0,2	92,2	15,4	0,9	1,9*
	G0	fenoxaprope + isoxadifen	8,1	0,5	94,3	8,7	1,0	-
	G2 controle		5,8	-0,2	94,6	7,5	0,4	0,86
	G2 selecionada com fenoxaprope + isoxadifen		2,1	-2,6	94,1	12,3	1,4	1,4*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência = GR₅₀ da G2 controle (não selecionada) ou G2 selecionada/GR₅₀ da G0 (não selecionada) dentro de cada biótipo e herbicida. *p<0,05 pelo teste F.

APÊNDICE 5. Análise de variância do experimento de investigação da evolução da resistência cruzada por metabolização usando aplicação prévia de malathion duas horas antes da aplicação dos diferentes herbicidas nas gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop e G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ.

Herbicida quincloraque

Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	352,73	6,35	0,002
Dose	7	35103,57	632,85	<0,001
Inibidor	1	5525,52	99,61	<0,001
Linhagem x Dose	14	360,77	6,50	<0,001
Linhagem x Inibidor	2	178,25	3,21	0,04
Dose x Inibidor	7	955,28	17,22	<0,001
Linhagem x Dose x Inibidor	14	140,15	2,52	0,003
Resíduo	144	55,46		
CV = 4,67%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	332,71	10,68	0,002
Dose	7	30873,46	991,93	<0,001
Inibidor	1	1622,11	52,11	<0,001
Linhagem x Dose	14	111,36	3,57	<0,001
Linhagem x Inibidor	2	290,42	9,33	<0,001
Dose x Inibidor	7	347,32	11,15	<0,001
Linhagem x Dose x Inibidor	14	68,18	2,19	0,01
Resíduo	144	31,12		
CV = 10,42%				

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	18864,06	166,59	<0,001
Dose	7	32675,40	288,56	<0,001
Inibidor	1	2662,63	23,51	<0,001
Linhagem x Dose	14	1434,55	12,66	<0,001
Linhagem x Inibidor	2	2244,27	19,81	<0,001
Dose x Inibidor	7	779,01	6,87	<0,001
Linhagem x Dose x Inibidor	14	509,40	4,49	<0,001
Resíduo	144	113,23		
CV = 9,56%				

continuação APÊNDICE 5. Análise de variância do experimento de investigação da evolução da resistência cruzada por metabolização usando aplicação prévia de malathion duas horas antes da aplicação dos diferentes herbicidas nas gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop e G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ.

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	20492,92	140,44	<0,001
Dose	7	28398,15	194,61	<0,001
Inibidor	1	4305,58	29,50	<0,001
Linhagem x Dose	14	1617,28	11,08	<0,001
Linhagem x Inibidor	2	1324,04	9,07	<0,001
Dose x Inibidor	7	470,86	3,22	0,003
Linhagem x Dose x Inibidor	14	481,81	3,30	<0,001
Resíduo	144	145,91		

CV = 9,32%

Herbicida diclofop

Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	160,93	2,71	0,069
Dose	7	47619,92	803,78	0,001
Inibidor	1	94,92	1,60	0,207
Linhagem x Dose	14	80,13	1,35	0,184
Linhagem x Inibidor	2	100	1,68	0,188
Dose x Inibidor	7	194,62	3,28	0,002
Linhagem x Dose x Inibidor	14	90,32	1,52	0,109
Resíduo	144	59,24		

CV = 4,67%

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	78,24	0,82	0,442
Dose	7	46115,84	483,90	<0,001
Inibidor	1	52,46	0,55	0,459
Linhagem x Dose	14	198,72	2,08	0,015
Linhagem x Inibidor	2	52,86	0,55	0,575
Dose x Inibidor	7	235,47	2,47	0,020
Linhagem x Dose x Inibidor	14	148,08	1,55	0,099
Resíduo	144	95,29		

CV = 7,83%

continuação APÊNDICE 5. Análise de variância do experimento de investigação da evolução da resistência cruzada por metabolização usando aplicação prévia de malathion duas horas antes da aplicação dos diferentes herbicidas nas gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop e G2 selecionada com fenoxaprop + isoxadifen dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ.

Herbicida cialofop

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Linhagem	2	903,81	24,58	<0,001
Dose	7	46325,20	1260,13	<0,001
Inibidor	1	14752,54	401,29	<0,001
Linhagem x Dose	14	480,92	13,08	<0,001
Linhagem x Inibidor	2	1058,39	28,79	<0,001
Dose x Inibidor	7	2286,58	62,19	<0,001
Linhagem x Dose x Inibidor	14	428,96	11,66	<0,001
Resíduo	144	36,76		
CV = 4,53%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	P
Linhagem	2	241,89	2,77	0,05
Dose	7	37485,76	429,82	<0,001
Inibidor	1	17802,46	204,12	<0,001
Linhagem x Dose	14	311,03	3,56	<0,001
Linhagem x Inibidor	2	998,69	11,45	<0,001
Dose x Inibidor	7	2071,51	23,75	<0,001
Linhagem x Dose x Inibidor	14	280,06	3,21	<0,001
Resíduo	144	87,21		
CV = 6,74%				

Capítulo II

APÊNDICE 6. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta para a definição de subdoses para os biótipos MOST e CAMAQ para os herbicidas fenoxaprope, imazetapir e mistura.

Herbicida fenoxaprope

Variável controle 21 DAA após aplicação.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	74,0	8,22	0,005
Dose	8	18426,3	2046,3	<0,001
Biótipo x Dose	8	40,1	1,9	0,09
Resíduo	54	9,0		
CV = 6,29%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	331,3	14,09	<0,001
Dose	8	15533,7	660,56	<0,001
Biótipo x Dose	8	115,0	4,89	<0,001
Resíduo	54	23,5		
CV = 10,4%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	182,4	10,91	0,001
Dose	8	15527,6	928,28	<0,001
Biótipo x Dose	8	56,9	1,40	0,15
Resíduo	54	16,7		
CV = 8,94%				

Herbicida imazetapir

Variável controle 21 DAA após aplicação.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	20368,3	999,67	<0,001
Dose	8	6760,9	331,8	<0,001
Biótipo x Dose	8	641,2	31,5	<0,001
Resíduo	54	20,4		
CV = 6,9%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	6919,3	395,3	<0,001
Dose	8	7715,8	440,7	<0,001
Biótipo x Dose	8	395,9	22,61	<0,001
Resíduo	54	17,5		
CV = 17,9%				

continuação APÊNDICE 6. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta para a definição de subdoses para os biótipos MOST e CAMAQ para os herbicidas fenoxaprope, imazetapir e mistura.

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	3676,0	505,05	<0,001
Dose	8	7749,7	1064,7	<0,001
Biótipo x Dose	8	173,4	23,83	<0,001
Resíduo	54	7,3		
CV = 12,3%				

Mistura - 75% fenoxaprope + 25% imazetapir

Variável controle visual aos 21 DAA

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	3068,1	275,21	<0,001
Dose	8	9170,1	822,57	<0,001
Biótipo x Dose	8	549,6	49,30	<0,001
Resíduo	54	11,1		
CV = 4,5%				

Massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	2839,4	220,91	<0,001
Dose	8	8888,1	691,5	<0,001
Biótipo x Dose	8	569,2	44,3	<0,001
Resíduo	54	12,9		
CV = 17,1 %				

Massa seca da parte aérea

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	1301,6	102,5	<0,001
Dose	8	8631,5	679,6	<0,001
Biótipo x Dose	8	96,6	7,61	<0,001
Resíduo	54	12,7		
CV = 16,9%				

Mistura - 50% fenoxaprope + 50% imazetapir

Controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	3916,1	286,6	<0,001
Dose	8	8370,5	612,7	<0,001
Biótipo x Dose	8	614,2	44,9	<0,001
Resíduo	54	13,7		
CV = 4,8 %				

continuação APÊNDICE 6. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta para a definição de subdoses para os biótipos MOST e CAMAQ para os herbicidas fenoxaprope, imazetapir e mistura.

Massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	2483,8	237,24	<0,001
Dose	8	9342,6	892,3	<0,001
Biótipo x Dose	8	376,9	36,0	<0,001
Resíduo	54	10,5		
CV = 14,5%				

Massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	1308,8	364,1	<0,001
Dose	8	8664,1	2410,2	<0,001
Biótipo x Dose	8	193,9	53,9	<0,001
Resíduo	54	3,6		
CV = 6,7 %				

25% fenoxaprope + 75% imazetapir

Controle visual aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	5922,3	874,4	<0,001
Dose	8	8088,7	1194,2	<0,001
Biótipo x Dose	8	588,4	86,8	<0,001
Resíduo	54	6,8		
CV = 3,38%				

Massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	4293,9	1307,2	<0,001
Dose	8	7748,5	2358,9	<0,001
Biótipo x Dose	8	419,8	127,8	<0,001
Resíduo	54	3,3		
CV = 9,04%				

Massa seca da parte aérea

FV	GL	QM	F	p
Biótipo	1	4238,9	947,5	<0,001
Dose	8	7817,8	1747,5	<0,001
Biótipo x Dose	8	514,7	115,1	<0,001
Resíduo	54	4,5		
CV = 10,82%				

APÊNDICE 7. Alinhamento das sequências do gene *ALS* dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ com o gene *ALS* de *A. thaliana* (NM_114714.2). As oito regiões encontradas naturalmente possíveis de modificar a enzima *ALS* e conferir resistência através de mutações no gene, estão grafadas em amarelo. Regiões através de mutações artificiais passíveis de conferir resistência estão grafadas em cinza. Trincas nucleotídicas grafadas codificam o aminoácido indicado. Similaridade entre as sequências está representada pelos asteriscos.

```

A. thaliana 301 AAAATCCTCGTCGAAGCTTTAGAACGTCAAGGCGTAGAAACCGTATTCGCTTACCCTGGA
MOST        1 -----CGAC-----GTCCTTCGCCTACCCCGGC
CAMAQ      1 -----CGAC-----GTCCTTCGCCTACCCCGGC
                **.*                **.******.*****.*

G121A122 M124
A. thaliana 361 GGTGCA121TCAATGGAGATTCACCAAGCCTTAACCCGCTCTTCCTCAATCCGTAACGTCCTT
MOST        23 GCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACCCGCTCCCCCGTCATCGCCAACCACCTC
CAMAQ      23 GCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACCCGCTCCCCCGTCATCGCCAACCACCTC
                **.***.******.*****.***.******.***.***.***.***.***.*

A. thaliana 421 CCTCGTCACGAACAAGGAGGTGTATTTCGAGCAGAAGGATACGCTCGATCCTCAGGTAAA
MOST        83 TTCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCTCCGGGTTTCGCGCGCTCGTCCGGCCGC
CAMAQ      83 TTCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCTCCGGGTTTCGCGCGCTCGTCCGGCCGC
                ...**.******.*****.***.******.***.***.***.***.***.*

A. thaliana 481 CCAGGTATCTGTATAGCCACTTCAGGTCCCGGAGCTACAAATCTCGTTAGCGGATTAGCC
MOST        143 GTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCGGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCC
CAMAQ      143 GTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCGGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCC
                ...**.******.***.***.******.***.***.***.***.***.***.*

V196 P197 R199
A. thaliana 541 GATGCGTTGTTAGATAGTGTTCCTCTGTAGCAATCACAGGACAAGTCC196CGTC197-GTAT199
MOST        203 GACGCGGTGCTCGACTCCATCCCATGGTTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCTCGCAT
CAMAQ      203 GACGCGGTGCTCGACTCCATCCCATGGTTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC-GCAT
                **.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

A205 F206
A. thaliana 600 GATTGGTACAGAT205GCG206TTTCAAGAGACTCCGATTGTTGAGGTAACGCGTTTCGATTACGAA
MOST        263 GATCGGCACCGACGCC-TCCAGGAGACGCCAATCGTTCGAGGTACCCCGCTCCATCACCAA
CAMAQ      262 GATCGGCACCGACGCCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTTCGAGGTACCCCGCTCCATCACCAA
                ***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

A. thaliana 660 GCATAACTATCTTGTGATGGATGTTGAAGATATCCCTAGGATTATTGAGGAAGCTTCTT
MOST        322 GCACAACTACCTCGTCCTCGACATCGACGACATCCCCCGCTCATACAGGAGGCGTTCTT
CAMAQ      322 GCACAACTACCTCGTCCTCGACATCGACGACATCCCCCGCTCATACAGGAGGCGTTCTT
                ***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

K256
A. thaliana 720 TTTAGCTACTTCTGGTAGACCTGGACCTGTTTTGGTTGATGTTCTCTAAA256GATATTCACAA
MOST        382 CCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCGGGGCCGGTGCCTCGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCA
CAMAQ      382 CCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCGGGGCCGGTGCCTCGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCA
                ..*.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

A. thaliana 780 ACAGCTTGCATTCTTAATTGGGAACAGG-CTATGAGATTACCTGGTTATATGTCTAGGA
MOST        442 GCAGATGGCCGTGCCCGTCT-GGAACACGCCCATGAGTCTGCCGGGTACATTGCCGCGCC
CAMAQ      442 GCAGATGGCCGTGCCCGTCT-GGAACACGCCCATGAGTCTGCCGGGTACATTGCCGCGCC
                .***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

A. thaliana 839 TGCCTAAACCTCCGGAAGATTCTCATTTGGAGCAGATTGTTAGGTTGATTTCTGAGTCTA
MOST        501 TGCCCAAGCCTCCGGCAACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTGGTGAGTTCGC
CAMAQ      501 TGCCCAAGCCTCCGGCAACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTGGTGAGTTCGC
                ***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

```


continuação APÊNDICE 7. Alinhamento das sequências do gene *ALS* dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ com o gene *ALS* de *A. thaliana* (NM_114714.2). As oito regiões encontradas naturalmente possíveis de modificar a enzima ALS e conferir resistência através de mutações no gene, estão grafadas em amarelo. Regiões através de mutações artificiais passíveis de conferir resistência estão grafadas em cinza. Trincas nucleotídicas grafadas codificam o aminoácido indicado. Similaridade entre as sequências está representada pelos asteriscos.

```

A. thaliana 1434 AGCCATAATAAGTACTGGTGTCTGGGCAACATCAAATGTGGGCGGCAGTTCTACAATTA
MOST        1086 GGCCATCATTGCCACTGGTGTGGGCAACATCAAATGTGGGCGGCAGTTCTACAATTA
CAMAQ      1097 GGCCATCATTGCCACTGGTGTGGGCAACATCAAATGTGGGCGGCAGTTCTACAATTA
          .*****.***.***.*****.*****.***.***.*****.*****.***

A. thaliana 1494 CAAGAAACCAAGGCAGTGGCTATCATCAGGAGGCCCTTGAGCTATGGGATTTGGACTTCC
MOST        1146 CAAGCGGCCAAGGCAGTGGTGTCTTCAGCTGGTCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGGC
CAMAQ      1157 CAAGCGGCCAAGGCAGTGGTGTCTTCAGCTGGTCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGGC
          ****.***.*****.***.***.*****.*****.*****.***

A. thaliana 1554 TGCTGCGATTGGAGCGTCTGTTGCTAACCCCTGATGCGATAGTTGTGGATATTGACGGAGA
MOST        1206 GGCTGCTGCTGGTGTCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTACAGTTGTGACATCGATGGGGA
CAMAQ      1217 GGCTGCTGCTGGTGTCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTACAGTTGTGACATCGATGGGGA
          .*****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***

A. thaliana 1614 TGGAAAGCTTTATAATGAATGTGCAAGAGCTAGCCACTATTCGTGTAGAGAATCTTCCAGT
MOST        1266 TGGCAGCTTCCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCCGCATGAGAACCCTCCAGT
CAMAQ      1277 TGGCAGCTTCCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCCGCATGAGAACCCTCCAGT
          ***.*****.***.*****.***.***.***.***.***.***.***

A. thaliana 1674 GAAGGTACTTTTATTAACAACCCAGCATCTTGGCATGGTTATGCAATGGGAAGATCGGTT
MOST        1326 GAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATT
CAMAQ      1337 GAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATT
          *****.***.***.*****.***.***.***.*****.*****.***

A. thaliana 1734 CTACAAAGCTAACCGAGCTCACACATTTCTCGGGGATCCGGCTCAGGAGGACGAGATATT
MOST        1386 CTACAAGGCCAACCGAGCACATACATACTTGGGGAACCCAGATAATGAGAGCGAGATATA
CAMAQ      1397 CTACAAGGCCAACCGAGCACATACATACTTGGGGAACCCAGAKAATGAGAGCGAGATATA
          *****.***.*****.***.***.***.***.***.***.***.*****

A. thaliana 1794 CCCGAACATGTTGCTGTTTGCAGCAGC-TTGC-GGGATTCCAGC-GGCGAGGGTGACAAA
MOST        1446 TCCGGATTTTCGTGACCATTGCCAAAGG-TTTT-AACATTCCAGC-GGTCCGTGTGACAAA
CAMAQ      1457 TCCGGATTTTCGTGACCATTGCCAAAGGKT--TYAACATTCCAGCRG-TCCGTGTGACAAA
          .***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***

A. thaliana 1851 GAAAGCAGATCTCCGAGAAGCTATTCAGACAATGCTGGATACACCAGGACCTTACCTGTT
MOST        1503 GAAGAGCGAAGTACGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCATACCTGTT
CAMAQ      1514 GAAGAGCGAAGTACGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCRTACCTGTT
          ***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***

A. thaliana 1911 GGATGTGATTTGTCCGCACCAAGAACATGTGTTGCCGATGATCCCGAGTGGTGGCACTTT
MOST        1563 GGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCATGATCCCGAGCGGTGGCGCTTT
CAMAQ      1574 GGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCATGATCCCGAGCGGTGGCGCTTT
          *****.***.***.***.***.***.***.*****.*****.*****

```


continuação APÊNDICE 8. Análise da variância do experimento de determinação do mecanismo de resistência ao herbicida imazetapir através do uso de inibidores.

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Inibidor	2	1509,1	43,5	<0,001
Dose	8	5817,3	167,7	<0,001
Inibidor x Dose	16	197,0	5,7	<0,001
Resíduo	81	34,7		
CV = 21,6%				

Massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Inibidor	2	6234,8	151,3	<0,001
Dose	8	8537,4	207,2	<0,001
Inibidor x Dose	16	218,0	5,3	<0,001
Resíduo	81	41,2		
CV = 12,71%				

Massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Inibidor	2	4191,1	148,8	<0,001
Dose	8	9281,7	329,7	<0,001
Inibidor x Dose	16	265,1	9,4	<0,001
Resíduo	81	28,1		
CV = 13,8%				

APÊNDICE 9. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle, G2 selecionadas com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com mistura.

Herbicida fenoxaprope

Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	2401,9	316,6	<0,001
Dose	8	24883,6	3288,0	<0,001
Geração x Dose	16	1086,9	143,3	<0,001
Resíduo	81	7,6		
CV = 4,66%				

continuação APÊNDICE 9. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle, G2 selecionadas com fenoxaprop, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com mistura.

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	720,0	45,81	<0,001
Dose	8	23471,4	1493,5	<0,001
Geração x Dose	16	616,5	39,23	<0,001
Resíduo	81	15,7		
CV = 10,07%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	724,2	43,63	<0,001
Dose	8	23510,7	1416,46	<0,001
Geração x Dose	16	538,1	32,42	<0,001
Resíduo	81	16,6		
CV = 10,56%				

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1329,2	186,8	<0,001
Dose	8	27940,9	3925,8	<0,001
Geração x Dose	16	831,1	116,8	<0,001
Resíduo	81	7,1		
CV = 4,97%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	863,9	62,65	<0,001
Dose	8	25876,4	1876,65	<0,001
Geração x Dose	16	647,3	46,94	<0,001
Resíduo	81	13,8		
CV = 8,57%				

Controle massa secada parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	307,8	25,20	<0,001
Dose	8	24324,0	1991,67	<0,001
Geração x Dose	16	418,8	34,29	<0,001
Resíduo	81	12,2		
CV = 8,52%				

continuação APÊNDICE 9. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle, G2 selecionadas com fenoxaprop, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com mistura.

Herbicida imazetapir

Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	125,1	13,35	<0,001
Dose	8	24457,5	2589,62	<0,001
Geração x Dose	16	189,5	20,06	<0,001
Resíduo	81	9,4		
CV = 4,99%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	50,1	7,36	<0,001
Dose	8	20630,3	3029,1	<0,001
Geração x Dose	16	55,9	8,2	<0,001
Resíduo	81	6,8		
CV = 9,23%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	19,8	1,57	<0,001
Dose	8	20452,7	1621,33	<0,001
Geração x Dose	16	46,1	3,66	<0,001
Resíduo	81	12,6		
CV = 7,56%				

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	189,7	10,14	<0,001
Dose	8	9972,7	532,93	<0,001
Geração x Dose	16	53,3	2,85	0,002
Resíduo	81	18,7		
CV = 9,02%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	766,3	56,97	<0,001
Dose	8	10010,2	744,24	<0,001
Geração x Dose	16	118,5	8,81	<0,001
Resíduo	81	13,5		
CV = 11,07%				

continuação APÊNDICE 9. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle, G2 selecionadas com fenoxaprop, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com mistura.

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	665,6	36,38	<0,001
Dose	8	9498,0	519,09	<0,001
Geração x Dose	16	126,5	6,91	<0,001
Resíduo	81	18,3		
CV = 12,33%				

Herbicidas em mistura (fenoxaprop + imazetapir) Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1878,4	309,6	<0,001
Dose	8	24504,2	4038,3	<0,001
Geração x Dose	16	492,6	81,2	<0,001
Resíduo	81	6,1		
CV = 4,04%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	744,6	61,1	<0,001
Dose	8	21817,9	1790,3	<0,001
Geração x Dose	16	142,7	11,7	<0,001
Resíduo	81	12,2		
CV = 9,2%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	722,4	46,69	<0,001
Dose	8	21389,0	1292,95	<0,001
Geração x Dose	16	84,6	5,12	<0,001
Resíduo	81	16,5		
CV = 10,45%				

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	4166,6	276,69	<0,001
Dose	8	19328,3	1283,54	<0,001
Geração x Dose	16	589,2	39,13	<0,001
Resíduo	81	15,1		
CV = 8,79%				

continuação APÊNDICE 9. Análise de variância do experimento de curva de dose-resposta com as gerações G0, G2 controle, G2 selecionadas com fenoxaprop, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionada com mistura.

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	2339,1	90,0	<0,001
Dose	8	18493,2	711,68	<0,001
Geração x Dose	16	235,3	9,06	<0,001
Resíduo	81	26,0		
CV = 10,88%				

Variável massa seca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	p
Geração	2	1366,4	50,8	<0,001
Dose	8	16073,9	598,1	<0,001
Geração x Dose	16	186,6	6,9	<0,001
Resíduo	81	26,9		
CV = 12,3%				

APÊNDICE 10. Massa seca da parte aérea (% do controle) das gerações G0, G2 controle e G2 selecionado de capim-arroz biótipo MOST e CAMAQ em relação à aplicação do herbicida fenoxapropre, imazetapir e mistura e parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ.

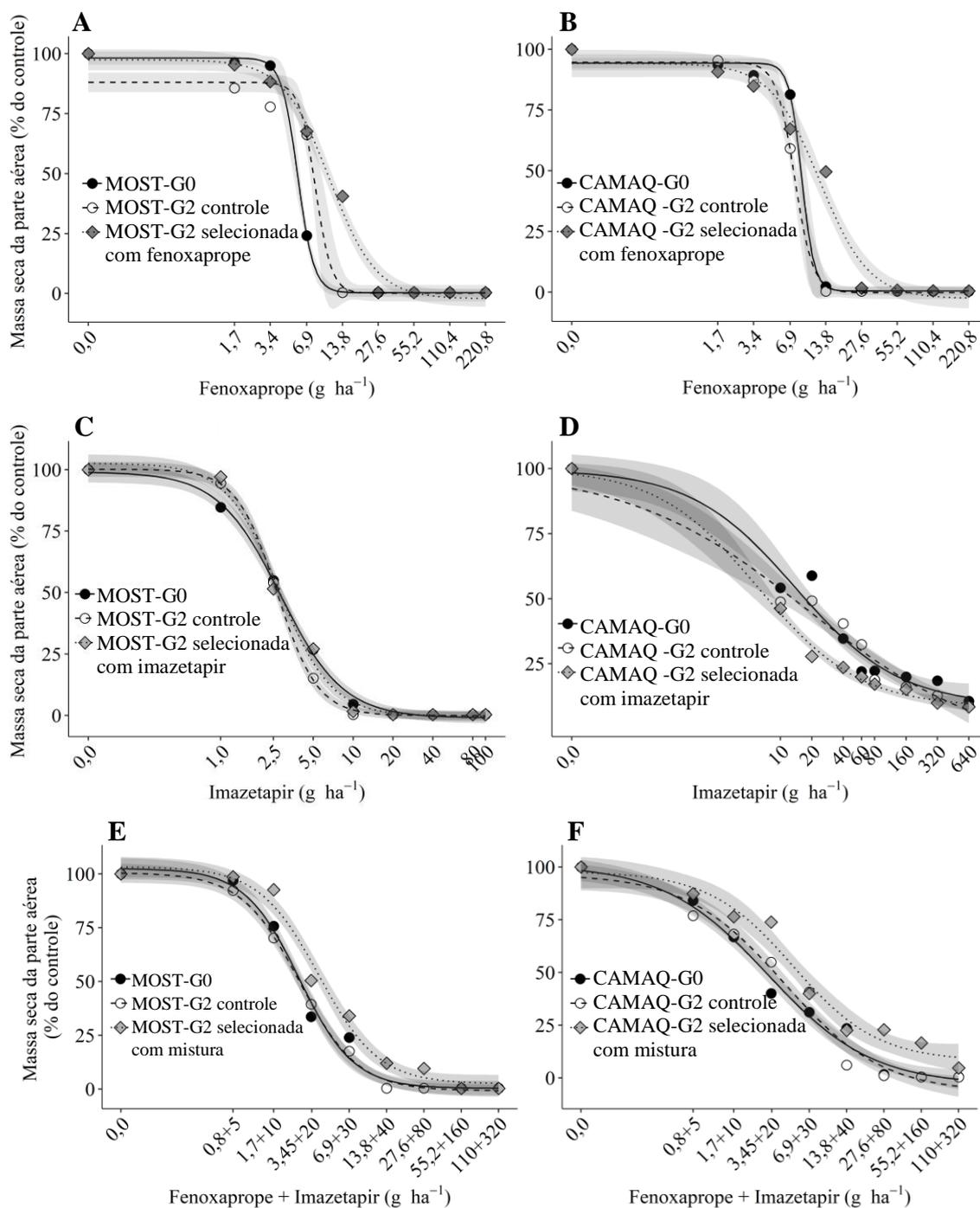


FIGURA. Massa seca da parte aérea (% do controle) das gerações G0, G2 controle e G2 selecionado de capim-arroz do biótipo MOST (A, C e E) e CAMAQ (B, D e F) em relação à aplicação do herbicida fenoxapropre (A e B), imazetapir (C e D) e mistura (fenoxapropre + imazetapir) (E e F).

Continuação APÊNDICE 10. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa seca da parte aérea das plantas de capim-arroz MOST e CAMAQ das gerações G0, G2 não selecionada e G2 selecionada com subdoses de fenoxaprope, imazetapir e mistura submetidas às diferentes doses de fenoxaprope, imazetapir e mistura.

Biótipo	Geração	Herbicida	b	c	d	GR ₅₀		FR
						Dose (g ha ⁻¹)	IC	
MOST	G0	fenoxaprope	6,4	0,3	98,2	5,8	±0,9	-
	G2 controle		7,7	0,1	87,9	7,9	±1,1	1,3*
	G2 selecionada com fenoxaprope		2,2	-2,2	97,4	10,7	±1,1	1,8*
	G0	imazetapir	1,8	-0,9	99,1	2,8	±0,3	-
	G2 controle		2,8	-0,1	100,2	2,6	±0,2	0,9
	G2 selecionada com imazetapir		2,2	-0,1	102,6	2,7	±0,3	0,9
	G0	mistura	1,9	0,3	102,5	2,7+15,8	±0,3	-
	G2 controle		1,8	-0,7	100,5	2,7+15,8	±0,3	1,0
	G2 selecionada com mistura		1,8	2,4	103,3	4,0+21,6	±0,4	1,4*
CAMAQ	G0	fenoxaprope	8,1	0,4	94,3	8,6	±2,0	-
	G2 controle		5,6	-0,2	94,6	7,5	±0,4	0,9
	G2 selecionada com fenoxaprope		2,1	-2,6	94,1	12,3	±1,4	1,4*
	G0	imazetapir	0,9	8,9	99,6	13,9	±4,0	-
	G2 controle		0,5	-8,6	99,8	18,3	±3,5	1,3
	G2 selecionada com imazetapir		0,9	8,3	100,1	6,1	±2,4	0,4*
	G0	mistura	1,0	-3,7	101,2	3,2+18,5	±0,9	-
	G2 controle		1,1	-6,7	96,7	4,3+22,4	±1,0	1,3
	G2 selecionada com mistura		1,3	7,9	97,9	5,1+24,7	±1,2	1,6*

b: declividade da curva; c: limite inferior; d: limite superior; GR₅₀: dose do herbicida que causa redução de 50% da variável controle; IC: intervalo de confiança do parâmetro GR₅₀ ($\alpha=0,05$); FR: fator de resistência; GR₅₀ da G2 controle (não selecionada) ou G2 selecionada/ GR₅₀ da G0 (não selecionada) dentro de cada biótipo. Mistura: fenoxaprope + imazetapir. *p<0,05 pelo teste F.

APÊNDICE 11. Análise de variância do experimento de investigação da evolução da resistência cruzada por metabolização usando aplicação prévia de malathion duas horas antes da aplicação dos diferentes herbicidas nas gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionado com mistura dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ.

Herbicida quincloraque

Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	182,55	3,24	0,023
Dose	7	47435,93	843,30	<0,001
Inibidor	1	2081,64	37,00	<0,001
Geração x Dose	21	219,08	3,89	<0,001
Geração x Inibidor	3	394,40	7,01	<0,001
Dose x Inibidor	7	401,06	7,13	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	141,49	2,51	<0,001
Resíduo	192	56,25		
CV = 4,3%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	15,48	0,48	0,69
Dose	7	38243,61	1208	<0,001
Inibidor	1	1501,93	47,45	<0,001
Geração x Dose	21	61,67	1,94	0,01
Geração x Inibidor	3	34,48	1,08	0,35
Dose x Inibidor	7	449,51	14,20	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	52,82	1,66	0,03
Resíduo	192	31,64		
CV = 10,21%				

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	9144,43	108,57	<0,001
Dose	7	50075,45	594,54	<0,001
Inibidor	1	9518,44	113,01	<0,001
Geração x Dose	21	858,74	10,19	<0,001
Geração x Inibidor	3	1271,09	15,09	<0,001
Dose x Inibidor	7	1067,72	12,67	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	274,90	3,26	<0,001
Resíduo	192	84,22		
CV = 4,09%				

continuação APÊNDICE 11. Análise de variância do experimento de investigação da evolução da resistência cruzada por metabolização usando aplicação prévia de malathion duas horas antes da aplicação dos diferentes herbicidas nas gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprop, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionado com mistura dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ.

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	8391,01	138,17	<0,001
Dose	7	40144,56	661,66	<0,001
Inibidor	1	10059,97	165,66	<0,001
Geração x Dose	21	1114,99	18,36	<0,001
Geração x Inibidor	3	2066,78	34,03	<0,001
Dose x Inibidor	7	1140,48	18,78	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	478,60	7,88	<0,001
Resíduo	192	60,72		
CV = 8,6%				

Herbicida Diclofope

Biótipo MOST

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	670,14	9,84	<0,001
Dose	7	62641,83	920,30	<0,001
Inibidor	1	1477,44	21,70	<0,001
Geração x Dose	21	256,08	3,76	<0,001
Geração x Inibidor	3	759,99	11,16	<0,001
Dose x Inibidor	7	588,82	8,65	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	156,49	2,29	0,0017
Resíduo	192	68,06		
CV = 4,84%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	424,29	2,01	<0,11
Dose	7	71998,05	341,68	<0,001
Inibidor	1	1987,04	9,42	0,002
Geração x Dose	21	460,46	2,18	0,003
Geração x Inibidor	3	2921,18	13,86	<0,001
Dose x Inibidor	7	970,89	4,60	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	966,22	4,58	<0,001
Resíduo	192	210,71		
CV = 3,99%				

continuação APÊNDICE 11. Análise de variância do experimento de investigação da evolução da resistência cruzada por metabolização usando aplicação prévia de malathion duas horas antes da aplicação dos diferentes herbicidas nas gerações G0, G2 selecionada com fenoxaprope, G2 selecionada com imazetapir e G2 selecionado com mistura dos biótipos de capim-arroz MOST e CAMAQ.

Biótipo CAMAQ

Variável controle aos 21 DAA.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	1115,79	10,00	<0,001
Dose	7	67605,23	606,04	<0,001
Inibidor	1	3766,89	33,76	<0,001
Geração x Dose	21	423,52	3,79	<0,001
Geração x Inibidor	3	476,52	4,27	0,006
Dose x Inibidor	7	1090,86	9,77	<0,001
Geração x Dose x Inibidor	21	300,79	2,69	0,0017
Resíduo	192	111,55		
CV = 3,36%				

Variável massa fresca da parte aérea.

FV	GL	QM	F	P
Geração	3	822,84	8,04	<0,001
Dose	7	64159,68	627,38	<0,001
Inibidor	1	485,77	4,65	0,03
Geração x Dose	21	187,05	1,82	0,01
Geração x Inibidor	3	470,77	4,60	0,003
Dose x Inibidor	7	180,37	1,76	0,09
Geração x Dose x Inibidor	21	231,55	2,26	0,002
Resíduo	192	102,26		
CV = 3,17%				