

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FRANCIELLI DIESEL

INVESTIGAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Borreria latifolia* (Aubl) E
Richardia brasiliensis (Gomes) A GLYPHOSATE E
COMPETITIVIDADE COM A CULTURA DA SOJA

TESE

PATO BRANCO

2016

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

FRANCIELLI DIESEL

**INVESTIGAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Borreria latifolia* (Aubl) E
Richardia brasiliensis (Gomes) A GLYPHOSATE E
COMPETITIVIDADE COM A CULTURA DA SOJA**

TESE

PATO BRANCO

2016

FRANCIELLI DIESEL

**INVESTIGAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Borreria latifolia* (Aubl) E
Richardia brasiliensis (Gomes) A GLYPHOSATE E
COMPETITIVIDADE COM A CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi

Co-orientador: Dr. Alvadi Antonio Balbinot Junior; Dr^a. Taciane Finatto; Dr^a. Fabiane Pinto Lamego

PATO BRANCO

2016

D564i

Diesel, Francieli.

Investigação da tolerância de *Borreria latifolia* (Aubl) e *Richardia brasiliensis* (Gomes) a Glyphosate e competitividade com a cultura da soja / Francieli Diesel. -- 2016.

170 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi

Coorientador: Prof. Dr. Alvadi Antonio Balbinot Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Taciane Finatto

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiane Pinto Lamego

Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2016.

Bibliografia: f. 143 - 163.

1. Absorção. 2. Translocação (Genética). 3. Melhoramento genético. 4. Ervas daninhas. I. Trezzi, Michelangelo Muzell, orient. II. Balbinot Junior, Alvadi Antonio, coorient. III. Finatto, Taciane, coorient. IV. Lamego, Fabiane Pinto, coorient. V. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. VI. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese n.º 024

Investigação da Tolerância de *Borreria Latifolia* (Aubl) e *Richardia brasiliensis* (Gomes) ao Glyphosate e Competitividade com a Cultura da Soja.

Por

Francielli Diesel

Tese apresentada às oito horas e trinta minutos do dia treze de dezembro de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Dr Alvadi Antonio Balbinot Junior
EMBRAPA SOJA/Londrina

Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi
UTFPR/Pato Branco
Orientador

Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto-
UTFPR/Pato Branco

Prof. Dr. Jean Carlo Possenti
UTFPR/Dois Vizinhos

Prof. Dr. Giovani Benin
Coordenador do PPGAG

TERMO DE APROVAÇÃO ASSINADO PELA BANCA ENCONTRA-SE NA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DO PPGAG”

Dedico à minha mãe (In memorian - Agosto de 2013), que sempre considerou o estudo a principal ferramenta no desenvolvimento de uma pessoa;

Ao meu amado pai, fonte de amor infinito, generosidade, humildade e sabedoria;

A minha irmã Grazzielli Diesel, pelo carinho e amor;

Ao meu noivo Rafael Vitali, pelos anos de companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por estar ao meu lado e me fazer forte para seguir em frente. Por colocar no meu caminho todas as pessoas abaixo mencionadas e dividir com as mesmas os melhores ou os mais difíceis momentos da minha caminhada.

Em especial a minha querida e amada mãe (Ivani Bavaresco Diesel) In Memoriam, por tudo que ela me ensinou, ela não teve a oportunidade de presenciar a concretização deste sonho, mas tenho certeza que ajudou, apoiou e torce de onde ela está, para que eu alcance e tenha sucesso nesta nova jornada.

Ao meu querido pai, que estando distante, sempre se fez presente apoiando meus estudos. Você é meu verdadeiro herói!

Ao meu noivo, por todo carinho, amor e paciência, por compreender a minha ausência e apoiar sempre meus estudos.

Ao meu orientador Prof. Michelangelo Muzell Trezzi pela compreensão, confiança, paciência e profissionalismo.

Aos meus co-orientadores, Dr. Alvadi Antonio Balbinot Junior, Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto e Dr^a. Fabiane Pinto Lamego pelo apoio, respeito, colaboração e atenção.

Aos amigos(as) e colegas de Pós-graduação do NIPED, Fortunato Pagnoncelli, Mateus Gallon, Elouize Xavier, Eli Marchesan, Antonio Brusamarello e Henrique Bittencourt pela convivência, amizade, receptividade e auxílios prestados, que dê alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos também amigos(as) e estagiários(as) do NIPED, Marcos Barancelli, Sorhaila Batistel, Renato Pasini, Pedro Mizerski, Matheus Viecelli, Bruna Cavalheiro e Renata Gobetti pela amizade, colaboração e dedicação na condução dos experimentos.

Agradecer ao professor Valdemar Tornisielo pela ajuda nos estudos de absorção e translocação desenvolvidos no CENA/USP Campus Luiz de Queiroz (Piracicaba - SP).

Aos professores de graduação e pós-graduação, porque hoje se vejo mais longe é porque me apoiei nos ombros de gigantes.

Aos funcionários da UTFPR, seu Otávio e Eloir.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Enfim, a todos, mesmo não citados, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

"... Bom mesmo é ir à luta com determinação

Abrçar a vida e viver com paixão

Perder com classe e vencer com ousadia

Porque o mundo pertence a quem se atreve

E a vida é muito para ser insignificante."

Charles Chaplin

RESUMO

DIESEL, Francieli Diesel. Investigação da tolerância de *Borreria latifolia* (Aubl) e *Richardia brasiliensis* (Gomes) a glyphosate e competitividade com a cultura da soja. 172 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Espécies de plantas daninhas tolerantes aos herbicidas estão amplamente disseminadas em todas as regiões brasileiras. O objetivo desta pesquisa foi ampliar as informações sobre espécies/biótipos da família Rubiaceae que permitam um melhor entendimento da variação da sua tolerância ao herbicida glyphosate, dos mecanismos fisiológicos e genéticos associados à tolerância e das perdas por competição das mesmas com a cultura da soja. Populações das espécies rubiáceas *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* foram coletadas no estado do Paraná e Norte de Santa Catarina. O primeiro estudo, que avaliou a resposta a doses de glyphosate nestas espécies/populações, foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema bifatorial, sendo o primeiro fator as populações de cada espécie (*B. latifolia* e *R. brasiliensis*), e o segundo níveis de glyphosate (0, 74, 163, 360, 792 e 1742 g ha⁻¹ de e.a.). Foram avaliados o controle visual aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA), massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) aos 28 DAA. A investigação da absorção e translocação com glyphosate marcado radioativamente (¹⁴C) foi conduzida em DIC, com três repetições, em esquema bifatorial, sendo o primeiro fator espécies/biótipos com resposta contrastante ao glyphosate e o segundo fator sete períodos de avaliação (2, 8, 24, 48 e 72 horas após aplicação com o herbicida (HAA)). Dois estudos foram realizados em casa-de-vegetação, em DIC para quantificar ceras epicuticulares presentes na superfície das folhas das espécies rubiáceas. O primeiro foi arranjado em esquema fatorial 6 x 2, com seis biótipos, três de *B. latifolia* e três de *R. brasiliensis* (sensível, média tolerância e alta tolerância para cada espécie) submetidos aos regimes próximo a capacidade de campo do solo (CC) e próximo ao ponto de murcha permanente (PMP). Posteriormente, foi procedida a extração das ceras epicuticulares com solventes e sua quantificação por pesagem. O segundo estudo foi arranjado em fatorial 2 x 3 x 5, sendo o primeiro fator as condições hídricas do solo (CC e PMP), o segundo fator três biótipos com respostas contrastantes ao glyphosate e o terceiro fator doses do herbicida glyphosate 0, 72, 163, 360 e 792 g e.a. ha⁻¹. Foram determinados os níveis de controle das plantas aos 14 e 28 DAA, MPAV e MPAS aos 28 DAA. Um estudo determinou a variabilidade genética existente entre indivíduos e populações de espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas distintas ao herbicida glyphosate (sensível e com maior tolerância) através da técnica RAPD. Dois estudos conduzidos em delineamento blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema bifatorial para determinar a capacidade competitiva de espécies rubiáceas com a cultura da soja. O primeiro fator foi constituído pelas espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* e o segundo pelas densidades 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 plantas m⁻². Foram avaliadas a altura de planta, área foliar e clorofila total nos estádios V6 e R5 da cultura, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e perda de rendimento de grãos. Houve variabilidade de resposta ao herbicida glyphosate entre os biótipos das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* coletados em diferentes locais do Paraná e Santa Catarina. A maior parte do herbicida absorvido ficou depositada na folha tratada, com maior translocação no biótipo sensível apenas nas avaliações efetuadas 48 e 72 HAA. A produção de ceras epicuticulares foi incrementada pelo déficit hídrico, com maior ênfase nos biótipos mais tolerantes ao glyphosate para ambas as espécies. Os marcadores RAPD foram satisfatórios na detecção de polimorfismo entre os indivíduos pertencentes a biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate. A espécie *B. latifolia* foi mais competitiva com a cultura da soja, comparativamente à *R. brasiliensis*, provocando maiores perdas em todas as variáveis analisadas.

Palavras-chave: *B. Latifolia*. *R. brasiliensis*. Curva dose-resposta. Ceras epicuticulares. Absorção. Translocação. RAPD. Variabilidade genética. Interferência.

ABSTRACT

DIESEL, Francielli. Research on the tolerance of *Borreria latifolia* (Aubl) and *Richardia brasiliensis* (Gomes) to glyphosate and competitiveness with soybean. 172 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2016.

Herbicide tolerant weed species are widely disseminated in all Brazilian regions. The objective of this research was to increase the information about the glyphosate tolerance on species / biotypes of the family Rubiaceae, allowing a better understanding of the physiological and genetic mechanisms associated to the tolerance and the soybean losses caused due to interference. Populations of *Borreria latifolia* and *Richardia brasiliensis* were sampled in the States of Paraná and Santa Catarina. The first study, which evaluated the response to doses of glyphosate in these species / populations, was conducted in a completely randomized design (DIC) in a bifactorial scheme, with the first factor being the populations of each species (*B. latifolia* and *R. brasiliensis*), and the second the glyphosate level (0, 74, 163, 360, 792 and 1742 g ha⁻¹ of ea). Visual control at 14 and 28 days after application (DAA), green aerial part mass (MPAV) and dry matter (MPAS) at 28 DAA were evaluated. The investigation of the absorption and translocation with radiophase (¹⁴C)-labeled glyphosate was conducted in DIC, with three replicates, in a bifactorial scheme, being the first factor species / biotypes with a glyphosate response and the second factor seven periods of evaluation (2,8 , 24, 48 and 72 hours after application with the herbicide (HAA). Two studies were carried out in greenhouse, in DIC to quantify epicuticular waxes present on the surface of the leaves of the rubiaceous species. The first one was arranged in a 6 x 2 factorial scheme, with six biotypes, three of *B. latifolia* and three of *R. brasiliensis* (sensitive, medium tolerance and high tolerance for each species) submitted to the regimes near soil field capacity (CC) and near the permanent wilting point (PMP). Subsequently, the epicuticular waxes were extracted with solvents and quantified by weighing. The second factor was arranged in factorial 2 x 3 x 5, the first factor being the soil water conditions (CC and PMP), the second factor three biotypes with contrasting responses to glyphosate and the third factor doses of the glyphosate herbicide 0, 72, 163, 360 and 792 g and ha⁻¹. The plants control levels were determined at 14 and 28 DAA, MPAV and MPAS at 28 DAA. Another study determined the genetic variability among individuals and populations of *B. latifolia* and *R. brasiliensis* species with different responses to the herbicide glyphosate (sensitive and with greater tolerance) using the RAPD technique. Two studies conducted in a randomized complete block design with four replications, in a two - factorial scheme to determine the competitive capacity of rubiaceous species with soybean culture. The first factor consisted of the species *B. latifolia* and *R. brasiliensis* and the second by the plant density (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 plants m⁻²). Plant height, leaf area and total chlorophyll in the V6 and R5 stages of the crop, number of pods per plant, number of grains per pod, mass of 1000 grains and loss of grain yield were evaluated. There was variability of response to glyphosate among the biotypes of *B. latifolia* and *R. brasiliensis* species collected in different locations of Paraná and Santa Catarina. Most of the absorbed herbicide was deposited on the treated leaf, with the highest translocation in the sensitive biotype only in the 48 and 72 HAA evaluations. The production of epicuticular waxes was increased by water deficit, with greater emphasis on glyphosate tolerant biotypes for both species. The RAPD markers were satisfactory in detecting polymorphism among individuals belonging to *B. latifolia* and *R. brasiliensis* biotypes with contrasting responses to glyphosate herbicide. The species *B. latifolia* was more competitive with the soybean crop, compared to *R. brasiliensis*, causing higher losses in all variables.

Key words: *B. latifolia*. *R. brasiliensis*. Dose-response curve. Epicuticular waxes. Field capacity, Permanent wilt point. ¹⁴C-glyphosate. Absorption. Translocation. RAPD. Genetic variability. Interference.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 – Controle (100 – controle) de biótipos de <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K.Schum. aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.	49
Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.....	49
Figura 3.2 - Redução da massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) de biótipos de <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K.Schum. aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	51
Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.....	51
Figura 3.3 - Controle (100 – controle) de biótipos de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	54
Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.....	54
Figura 3.4 - Redução da massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) de biótipos de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	57
Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.....	57
Figura 4.1 – Absorção (A) e total translocado (B) para biótipos de <i>R. brasiliensis</i> em resposta a aplicação de glyphosate radiomarcado. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	72
Figura 4.2 – Distribuição de glyphosate radiomarcado em biótipos de <i>R. brasiliensis</i> no período de 2 (A), 8 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 (E) horas após a aplicação (HAA). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	73
Figura 4.3 – Total absorvido (A) e total translocado (B) para biótipos de <i>B. latifolia</i> em resposta a aplicação de glyphosate radiomarcado. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	74
Figura 4.4 – Distribuição de glyphosate radiomarcado em biótipos de <i>B. latifolia</i> no período de 2 (A), 8 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 (E) horas após a aplicação (HAA). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	75
Figura 5.1 – Quantificação de cera epicuticular por área foliar em biótipos de <i>R. brasiliensis</i> (A) e <i>B. latifolia</i> (B), com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate (sensível, moderadamente tolerante e tolerante) submetidos a dois regimes hídricos (CC = 80% da umidade da Capacidade de Campo e PMP = umidade próxima ao Ponto de Murcha Permanente). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	87
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p= 0,05$), minúsculas comparam condições hídricas dentro de cada biótipo e maiúsculas comparam biótipos dentro de cada condição hídrica.....	87
Figura 5.2 - Níveis de controle de plantas de biótipos de <i>R. brasiliensis</i> a doses de glyphosate aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	92
Figura 5.3 - Níveis de controle de plantas de biótipos de <i>B. latifolia</i> a doses de glyphosate aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	92
Figura 5.4 – Massa da parte aérea verde (MPAV) (A) e massa da parte aérea seca (MPAS) de biótipos de <i>R. brasiliensis</i> em resposta a doses de glyphosate sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	93

Figura 5.5 - Massa da parte aérea verde (MPAV) (A) e massa da parte aérea seca (MPAS) de biótipos de <i>B. latifolia</i> em resposta a doses de glyphosate sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	94
Figura 6.1 – Dendrograma dos oito indivíduos de <i>B. latifolia</i> (quatro tolerantes e quatro sensíveis), gerado com dados dos marcadores RAPD. A linha de corte indica a similaridade média de 0,43. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	109
Figura 6.2 – Dendrograma dos oito indivíduos de <i>R. brasiliensis</i> (tolerantes e sensíveis) gerado com dados dos marcadores RAPD. A linha de corte indica a similaridade média de 0,49. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	111
Figura 7.1 - Precipitação pluvial, temperatura mínima e máxima durante os períodos em que foram conduzidos os experimentos nas safras 2013/2014 (safrinha) (a) e 2014/2015 (safra normal) (b). Fonte: IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	119
Figura 7.2 – Altura de planta em estágio fisiológico V6 (A) e R5 (B) e clorofila total (C) e área foliar (D) no estágio V6 da cultivar de soja V-TOP RR, em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.	124
Figura 7.3 – Altura de planta em maturação fisiológica (A), massa da parte aérea seca (B) e altura da inserção da primeira vagem (C) na maturação fisiológica da cultivar de soja V-TOP RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	125
Figura 7.4 – Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), massa de 1000 grãos (C) e perda de rendimento (D) da cultivar de soja V-TOP RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	126
Figura 7.5 – Altura de planta (A), clorofila total (B) e área foliar (C) em estágio fisiológico V6 da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	129
Figura 7.6 – Altura de planta (A), clorofila total (B) e área foliar (C) em estágio fisiológico R5 da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	130
Figura 7.7 – Altura de planta em maturação fisiológica (A), massa da parte aérea seca (B) e altura de inserção primeira vagem (C) na maturação fisiológica da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades de <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	131
Figura 7.8 – Número de vagem por planta (A), número de grãos por vagem (B) massa de mil grãos (C) e perda de rendimento (D) da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	132

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 – Identificação dos biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* empregados nos experimentos com seus respectivos locais de coleta. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....46
- Tabela 3.2 - Parâmetros das equações ajustadas, C50 e C80 para o controle dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 14 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... 50
- Tabela 3.3 - Parâmetros das equações ajustadas, C50, C80 e Fator de tolerância (FT) para o controle dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....51
- Tabela 3.4 - Parâmetros das equações ajustadas, GR50, GR80 e Fator de tolerância (FT) para MPAS dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....52
- Tabela 3.5 – Significância e coeficientes de correlação entre as variáveis controle visual (100 - controle) e MPAS dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum (a) e para os biótipos de *Richardia brasiliensis* (b) aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016..... 53
- Tabela 3.6 - Parâmetros das equações ajustadas, C50 e C80 para o controle dos biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 14 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... 55
- Tabela 3.7 - Parâmetros das equações ajustadas, C50, C80 e Fator de tolerância (FT) para o controle dos biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....56
- Tabela 3.8 - Parâmetros das equações ajustadas, GR50, GR80 e Fator de tolerância (FT) para MPAS dos biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....57
- Tabela 3.9 - Características dos pontos de coletas dos biótipos tolerantes e sensíveis ao glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... 61
- Tabela 4.1 – Identificação e características dos locais em que foram coletadas as sementes dos biótipos tolerantes e suscetível ao glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....70
- Tabela 4.2 - Parâmetros das equações e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis absorção e total translocado em resposta a períodos de avaliação de glyphosate radiomarcado em biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* com respostas contrastantes ao glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... 72
- Tabela 5.1 - Parâmetros das equações ajustadas para a variável resposta controle dos biótipos de *B. Latifolia* e *Richardia brasiliensis* submetidos a condições hídricas do solo (CC e PMP) em resposta a aplicação de doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 90
- Tabela 5.2 - Parâmetros das equações ajustadas para a variável massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) para biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* submetidos a condições hídricas do solo (CC e PMP) em resposta a aplicação de doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... 91
- Tabela 5.3 – Valores de GR50 para biótipos de *R. brasiliensis* submetidos próximos a CC e PMP em resposta a doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....94

Tabela 5.4 – Valores de GR50 para biótipos de <i>B. latifolia</i> submetidos próximos a CC e PMP em resposta a doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	95
Tabela 5.5 – Coeficientes de correlação entre as variáveis quantidade de ceras e dose necessária para reduzir 50% matéria seca da parte aérea (GR50) para as espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> em resposta a duas condições de disponibilidade de água no solo (CC e PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	95
Tabela 6.1 - Iniciadores RAPD utilizados para amplificação do DNA de oito biótipos de <i>B. latifolia</i> e oito biótipos de <i>R. brasiliensis</i> com resposta contrastante ao herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	105
Tabela 6.2 - Relação dos iniciadores RAPD utilizados em <i>Borreria latifolia</i> , com bom perfil de amplificação e seus respectivos parâmetros: Número total de fragmentos amplificados (NT), intervalo dos fragmentos (IF), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), índice de marcador (MI) e poder de resolução (RP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	107
Tabela 6.3 - Relação dos iniciadores RAPD utilizados em <i>Richardia brasiliensis</i> com bom perfil de amplificação e seus respectivos parâmetros: Número total de fragmentos amplificados (NT), intervalo dos fragmentos (IF), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), índice de marcador (MI) e poder de resolução (RP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	110
Tabela 7.1 - Distribuição granulométrica e atributos químicos de Latossolo Vermelho Distroférico. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	120
Tabela 7.2 - Parâmetros das equações e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis em resposta a interferência com as espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> na cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	123
Tabela 7.3 - Parâmetros das equações para determinar a relação entre as espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> e a perda percentual do rendimento da cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	127
Tabela 7.4 - Parâmetros das equações e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis em resposta a interferência com as espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> na cultivar de soja BMX Ativa RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	128
Tabela 7.5 - Parâmetros das equações para determinar a relação entre as espécies <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> e a perda percentual do rendimento da cultivar de soja BMX Ativa RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	133

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

BR	Brasil
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
PR	Unidade da Federação – Paraná
SC	Unidade da Federação – Santa Catarina
SP	Unidade da Federação – São Paulo
USP	Uniersidade de São Paulo
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
BBCH	Escala Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry
CC	Capacidade de Campo
CGM	Culturas geneticamente modificadas
DAA	Dias após aplicação
DAT	Dias após tratamento
e.a.	Equivalente ácido
ECL	Espectrometria de cintilação
EPSPS	Enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
Fig.	Figura
FR	Fator de resistência
FT	Fator de tolerância
ha ⁻¹	Por hectare
HAT	Horas após aplicação
i.a.	Ingrediente ativo
LEU	Leucina
MI	Índice do marcador
MPAS	Massa da parte aérea seca
MPAV	Massa da parte aérea verde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIC	Poder de informações polimórficas
PI	Planta
PMP	Ponto de murcha permanente
PRO	Prolina
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RP	Poder de resolução
RR	Roundup ready
spp	Sub-espécie
Tab.	Tabela
TAQ-DNA	Enzima DNA polimerase termoestável
THR	Tirosina
T°C	Temperatura
TRP	Triptofano
UR	Umidade relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcentagem
®	Marca registrada
<	Menor que
>	Maior que
¹⁴ C	Carbono radiomarcado
C ₅₀	Dose necessária para controlar 50% da população
C ₈₀	Dose necessária para controlar 80% da população
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
d'NTP	Nucleotídeo Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
D ₅₀	Densidade onde ocorre 50% de perda de rendimento
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
GR ₅₀	Dose necessária para reduzir 50% a massa seca
GR ₈₀	Dose necessária para reduzir 80% a massa seca
Kb ou kbp	1000 pares de bases
Kow	Coefficiente de partição octanol/água
L	Litros
Lbf/pol ²	Libra força por polegada quadrada
m	Metros
M	Molar
m ²	Metro quadrado
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	MiliMolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
p<0,05	Significância a 5%
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKa	Constante de ionização
s	Segundos
TRIS-Hcl	Cloridrato de trizma
V	Volts
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES DANINHAS RUBIÁCEAS.....	23
2.2 TOLERÂNCIA E RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS.....	24
2.3 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA EM PLANTAS DANINHAS.....	26
2.3.1 Absorção.....	26
2.3.2 Translocação.....	29
2.3.3 Metabolização.....	31
2.3.4 Sequestro ou compartimentalização do herbicida.....	32
2.3.5 Alteração no sítio de ação do herbicida.....	33
2.3.6 Superexpressão da enzima-alvo.....	33
2.4 TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES AO GLYPHOSATE.....	34
2.5 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD NA DETECÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DANINHAS.....	37
2.6 COMPETIÇÃO DE PLANTAS DANINHAS COM A CULTURA DA SOJA.....	38
3 TOLERÂNCIA AO GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE <i>Borreria latifolia</i> E <i>Richardia brasiliensis</i>.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	42
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.3.1 Resposta de biótipos de <i>B. latifolia</i>	48
3.3.2 Resposta de biótipos de <i>R. brasiliensis</i>	53
3.4 CONCLUSÕES.....	62

4 ABSORÇÃO FOLIAR E TRANSLOCAÇÃO DE GLYPHOSATE RADIOMARCADO EM BIÓTIPOS DE <i>B. latifolia</i> e <i>R. brasiliensis</i> COM RESPOSTA CONTRASTANTES AO GLYPHOSATE.....	64
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	64
4.1 INTRODUÇÃO.....	65
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.3.1 <i>Richardia brasiliensis</i>	72
4.3.2 <i>Borreria latifolia</i>	74
4.4 CONCLUSÕES.....	79
5 EFEITO DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NO SOLO SOBRE A QUANTIDADE DE CERAS EPICUTICULARES E RESPOSTA AO GLYPHOSATE EM ESPÉCIES E BIÓTIPOS DE RUBIÁCEAS.....	80
RESUMO.....	80
ABSTRACT.....	80
5.1 INTRODUÇÃO.....	81
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.3.1 Quantificação de ceras epicuticulares em biótipos de <i>R. brasiliensis</i> e <i>B. latifolia</i> sob dois regimes hídricos distintos.....	86
5.3.2 Resposta dos biótipos de <i>R. brasiliensis</i> e <i>B. latifolia</i> ao herbicida glyphosate sob dois regimes hídricos distintos.....	89
5.4 CONCLUSÕES.....	97
6 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL EM BIÓTIPOS DE ERVA-QUENTE E POAIA-BRANCA COM RESPOSTAS DISTINTAS AO GLYPHOSATE.....	98
RESUMO.....	98

ABSTRACT.....	98
6.1 INTRODUÇÃO.....	99
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	102
6.2.1 Material vegetal.....	102
6.2.2 Extração do DNA.....	103
6.2.3 Quantificação do DNA.....	104
6.2.4 Amplificação do DNA.....	104
6.2.5 Análises estatísticas – RAPD.....	105
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
6.3.1 <i>Borreria latifolia</i>	107
6.3.2 <i>Richardia brasiliensis</i>	109
6.3.3 Discussão.....	111
6.4 CONCLUSÕES.....	115
7 INTERFERÊNCIA DE <i>Borreria latifolia</i> e <i>Richardia brasiliensis</i> NA CULTURA DA SOJA.....	116
RESUMO.....	116
ABSTRACT.....	116
7.1 INTRODUÇÃO.....	117
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	119
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
7.3.1 Cultivar V-TOP RR.....	123
7.3.2 Cultivar BMX ATIVA RR.....	127
7.3.3 Discussão.....	133
7.4 CONCLUSÕES.....	136
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	138
REFERÊNCIAS.....	143

1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por produção de alimentos é um fato cada vez mais pertinente em debates sobre segurança alimentar. Segundo a FAO (2013), até o ano de 2050, a humanidade terá cerca de 9 bilhões de habitantes, o que aumentará a demanda por alimentos. Um dos grandes desafios do atual agronegócio é ampliar a produção agrícola com a finalidade de atender à demanda crescente de alimentos e também para manter e melhorar a qualidade dos alimentos produzidos.

A presença de plantas daninhas em áreas de lavoura tem sido apontada como um dos fatores mais importantes que contribuem para a redução da produtividade das culturas, evidenciando grande ameaça à produção sustentável de alimentos. Sua importância é tamanha, que cerca da metade dos agroquímicos comercializados no mundo, é representado pelos herbicidas (THEISEN; RUEDELL, 2004). Ao nível mundial, as perdas médias reais ocasionadas pela interferência das plantas daninhas atingem 4,3 a 15,2% do rendimento das culturas de algodão, arroz, batata, milho, soja e trigo (OERKE, 2006).

Entre os métodos de controle de plantas daninhas, o emprego de herbicidas tem sido o mais utilizado, devido à maior praticidade e grande eficiência (FERREIRA et al., 2009). O Brasil é responsável por 84% do consumo de agrotóxicos da América Latina. A partir de 2000 o Brasil aumentou a importação de agrotóxicos, e em 2007 encontrava-se como um dos maiores importadores mundiais, atrás apenas da França, Alemanha, Canadá e Reino Unido (PELAEZ, 2010).

No país existem 476 marcas registradas de herbicidas, com aproximadamente 100 ingredientes ativos (i.a.) pertencentes a diferentes mecanismos de ação. A comercialização de herbicidas no Brasil, no ano de 2011, foi de 40.362 toneladas de i.a.. Considerando toda a gama de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas, acaricidas, fungicidas, entre outros), a cultura em que são mais utilizados agrotóxicos é a soja, responsável por 43,5%, o algodão em segundo lugar (12,5%), seguido da cana-de-açúcar (11,6%), milho safrã (5,0%), milho safrinha (3,8%), café (3,7%), citros (3,1%), culturas de inverno (2,4%) e feijão (2,4%). Esse conjunto de

culturas soma 87,8% do valor comercializado nesse ano. Entre os estados consumidores, o Paraná é o terceiro colocado com 12,1%, ficando atrás do líder Mato Grosso (20,6%) e de São Paulo (15,3%) (FERREIRA; CAMARGO; VEGRO, 2012).

O controle químico apresenta inúmeras vantagens, entretanto, quando utilizado de maneira equivocada pode acarretar muitos malefícios, tais como o controle ineficiente das espécies daninhas, ocorrência de danos e perdas produtivas em culturas comerciais causadas por fitotoxicidade e também problemas ambientais (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Além disso, a utilização sequencial de um mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação e espectro de controle de plantas daninhas por diversos anos pode selecionar populações de plantas daninhas resistentes e também tolerantes a herbicidas.

Com a introdução no Brasil de cultivares de soja geneticamente modificadas, com resistência ao herbicida glyphosate (soja RR®), em princípio dos anos 2000, o manejo de plantas daninhas sofreu alterações. Assim, o uso do herbicida glifosato aumentou, pois permitiu o uso deste herbicida em pós-emergência da cultura (PEREIRA et al., 2008). E mais recentemente, lançou-se no mercado o milho RR®, alavancando ainda mais o uso dessa molécula herbicida. Atualmente, a maioria dos agricultores realiza três aplicações do herbicida glyphosate por ciclo da soja (NOHATTO, 2010). Essa prática do uso repetitivo do herbicida glyphosate, aliada a outras formas de manejo inadequadas nas lavouras, desencadeou intensificação da seleção de plantas daninhas em sistemas de cultivo agrícolas. A seleção intraespecífica de plantas daninhas resulta em biótipos resistentes. A seleção interespecífica resulta em mudança da flora para espécies mais tolerantes.

A resistência de populações de plantas daninhas a herbicidas é, atualmente, uma das principais dificuldades enfrentadas pelo setor agrícola ao nível mundial. Em todo o Brasil, existem milhões de hectares infestados com espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, entre elas, *Conyza bonariensis*, *Conyza canadenses*, *Digitaria insularis*, *Chloris elata*, *Lolium perene* ssp. *multiflorum*, *Eleusine indica*, *Amaranthus palmeri*, *Conyza sumatrensis*, entre outras (HEAP, 2016).

Desde a introdução de cultivares geneticamente modificadas resistentes ao glyphosate, na cultura da soja, têm ocorrido a seleção de espécies tolerantes a este herbicida, como trapoerabas (*Commelina* spp.), cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.), poaia-branca (*R. brasiliensis*), erva-quente (*B. latifolia*), entre outras. Esse fenômeno tem ocorrido em outros locais do mundo, em espécies tais como *Ambrosia artemisiifolia* e *Sesbania exaltata*, entre outras.

A tolerância de plantas daninhas aos herbicidas está disseminada do Norte ao Sul do Brasil (GALON et al., 2013). Em lavouras de soja da região Sul do país, espécies pertencentes às famílias Convolvulaceae, Rubiaceae e Commelinaceae são as que apresentam maior importância dentre as tolerantes ao herbicida glyphosate. Há fortes indícios que a dose necessária para controlar determinadas populações tolerantes esteja se deslocando para um patamar superior, resultado de processo de seleção em que indivíduos que toleram doses mais elevadas sobrevivem e indivíduos mais sensíveis são eliminados.

Nas áreas infestadas com espécies tolerantes é frequente a utilização de doses de herbicidas acima da recomendada (GALON et al., 2013), gerando impacto negativo às espécies cultivadas e forte impacto ambiental e à saúde humana e indicando que o processo de seleção referido acima está em curso. O incremento de doses de herbicidas para controlar populações tolerantes, que tem sido observado em lavouras de diversas regiões do Brasil reflete, provavelmente, uma elevada variabilidade genética existente em espécies de plantas daninhas e/ou também pode estar relacionado com o acúmulo de genes que conferem maior tolerância em biótipos.

Há vários exemplos na literatura demonstrando que a tolerância de plantas daninhas ao glyphosate se deve à absorção ou translocação diferencial do herbicida (WYRILL; BURNSIDE, 1976; SANDBERG et al., 1980; WESTWOOD et al., 1997; SATICHIVI et al., 2000; CHACHALIS et al., 2001). Já, a metabolização diferencial de glyphosate é mais frequentemente detectada em espécies cultivadas, como soja (*Glycine max* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e ervilha (*Pisum sativum*) (KOMOBA, et al., 1992; UOTILA et al., 1995; RUEPPEL et al., 1977).

Espécies dos gêneros *Borreria* (Spermacoce) e *Richardia*, da família

Rubiaceae, apresentam grande importância na região Sudoeste do Paraná e Norte de Santa Catarina, especialmente em áreas cultivadas com a cultura da soja. As espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* são encontradas de forma generalizada na região. Baseando-se em informações empíricas de técnicos e agricultores, as duas espécies citadas acima apresentam respostas distintas a características do ambiente. A presença de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* é mais comum em solos sem problemas de drenagem e ácidos (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010; KISSMANN; GROTH, 1995).

Atualmente, no Brasil, para um grande número de espécies daninhas existem poucas informações na literatura que determinem o seu potencial de dano à culturas agrícolas. Esse é o caso das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* e é importante, portanto, ampliar o número de informações disponíveis sobre as perdas de rendimento na cultura da soja submetida à convivência com densidades crescentes de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*.

A caracterização das populações de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* quanto à sua tolerância ao glyphosate, propiciará a determinação da amplitude dos valores de C_{50} (dose de herbicida necessária para controlar 50% da população). Elevada amplitude de valores de C_{50} e diferenças de C_{50} entre populações com diferentes níveis de intensidade de uso do glyphosate pode indicar que tem havido intensificação da seleção de populações pelo emprego demasiado desse herbicida nas áreas agrícolas. A caracterização das populações quanto ao grau de tolerância ao glyphosate auxiliará na elucidação dos principais mecanismos de tolerância desses biótipos ao glyphosate, através da análise de absorção foliar, translocação e quantificação de ceras epicuticulares. Análise molecular de biótipos de ambas as espécies auxiliará na detecção de mutações e na determinação da variabilidade genética entre biótipos.

Diante disso, verifica-se a necessidade de investigação dos mecanismos responsáveis ou causas prováveis da seleção dessas espécies. Através do entendimento dos mecanismos de tolerância, será de suma importância para que alternativas de manejo sejam planejadas, melhorando assim a eficácia do produto, preservando os herbicidas e garantindo um controle eficiente e econômico para a agricultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES DANINHAS RUBIÁCEAS

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies a nível mundial (DELPRETE, 1999). No Brasil, esta família compreende cerca de 130 gêneros e 1.500 espécies, distribuídas em formações vegetais diferentes, com uma grande ocorrência na Mata Atlântica (SOUZA; LORENZI, 2005).

O Brasil é um país que oferece grande diversidade de espécies rubiáceas nativas ou introduzidas, muitas apresentam alto valor econômico, como cafeeiro, ipecacuanha (medicinal), gardênia (ornamental), entre outras. Por outro lado, muitas espécies apresentam aspectos negativos como plantas infestantes (KISSMANN; GROTH, 1995).

Espécies infestantes da família Rubiaceae pertencentes aos gêneros *Borreria* (*Spermacoce*) e *Richardia* apresentam importância na região Sudoeste do Paraná, especialmente em áreas cultivadas com a cultura da soja. As espécies *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum e *Richardia brasiliensis* Gomes são encontradas de forma generalizada nessa região. A espécie *Borreria latifolia* é planta nativa no Brasil, ocorrendo com maior intensidade nas regiões Sudeste, Centro-oeste, Sul e também Norte (KISSMANN; GROTH, 1995). É uma espécie herbácea, anual, que se desenvolve em todo o país, vegetando em áreas ocupadas por lavouras anuais e/ou perenes (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). A propagação dessa espécie se dá via sementes, possui nítida preferência por solos pobres e ácidos e tolera um certo grau de sombreamento, competindo assim com a cultura durante todo o ciclo (LORENZI, 2008).

Richardia brasiliensis é uma espécie herbácea, anual e que se desenvolve em todo o país de forma espontânea (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). Possui grande vigor vegetativo, cobrindo completamente o solo a semelhança de um tapete, sendo considerada uma das principais infestantes das culturas de soja e milho das regiões Sul e Centro-Oeste, apresentando maior interferência no início dos ciclos de culturas de verão (LORENZI, 2008).

2.2 TOLERÂNCIA E RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS

A utilização de herbicidas para manejar plantas daninhas é uma prática que se expandiu em todas as condições agrícolas e não agrícolas, sendo considerado o método mais eficiente e muitas vezes, o mais econômico, atualmente, os herbicidas vem sendo empregados como o único método de controle em áreas agrícolas. Entretanto, o uso intensivo e inadequado de herbicidas pode provocar efeitos negativos no ambiente, como a disseminação de espécies daninhas com maior tolerância ou seleção de espécies (biótipos) resistentes aos diferentes mecanismos de ação herbicida existentes (FERREIRA et al., 2009). A aplicação repetitiva de herbicidas com o mesmo espectro de ação na cultura do arroz por quatro anos tem conduzido à predominância de *Eleocharis kuroguwae*, *Cyperus serotinus* e *Scirpus juncoides* (WILSON, 1998).

Em uma população de plantas podem existir indivíduos que expressam diferentes reações de tolerância ou de resistência a um determinado herbicida. A tolerância é uma característica existente na planta mesmo antes da aplicação do herbicida em uma área, ou seja, ela está relacionada com a habilidade da planta sobreviver e se reproduzir após o tratamento herbicida, mesmo sofrendo injúrias. Além disso, outros fatores como estágio de desenvolvimento e/ou características morfofisiológicas da espécie, condições climáticas antes, durante e logo após a aplicação do herbicida, podem afetar a tolerância das culturas e plantas daninhas aos herbicidas aplicados. O uso de volume de calda apropriado também pode influenciar na resposta de controle a determinado herbicida, pois garante maior cobertura das plantas daninhas. O emprego de adjuvantes na calda de aplicação proporciona maior absorção do herbicida e dessa forma incrementa o controle, e evitará a entrada de propágulos e redução de suas frequências no banco de sementes (CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

Por outro lado, a resistência é a habilidade de uma planta sobreviver e reproduzir, após exposição a uma dose de herbicida normalmente usada (dose de bula) que em condições normais, controla os demais integrantes da mesma população. A resistência pode ocorrer naturalmente, através da seleção ou ser induzida por técnicas de engenharia genética ou seleção de variantes produzidas

por culturas de tecidos ou mutagêneses (HEAP, 2006).

A seleção natural é amplamente aceita como explicação do desenvolvimento da resistência. Sendo assim, biótipos resistentes a herbicidas geralmente estão presentes em baixa frequência numa espécie de planta daninha. Quando o herbicida é aplicado, o mesmo atua como agente de pressão de seleção, as plantas suscetíveis são mortas e as plantas resistentes sobrevivem e se reproduzem sem competição das plantas suscetíveis (CHRISTOFFOLETTI et al., 2008).

A tecnologia da soja RR® permitiu reduzir ou eliminar a necessidade da aplicação de outros herbicidas para o manejo de diferentes espécies de plantas daninhas, o que contribuiu para o aumento da pressão de seleção e o aparecimento de biótipos com respostas contrastantes ao glyphosate (CHRISTOFFOLETTI et al., 2008). Ou seja, o uso contínuo e repetitivo do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, torna a seleção de espécies inevitável.

Analisando as características favoráveis à seleção de espécies tolerantes e/ ou resistentes a herbicidas, conclui-se que o glyphosate possui baixa probabilidade de seleção de espécies. Entretanto, as plantas daninhas corda-de-violão, poaia-branca e trapoeraba, são exemplos de espécies tolerantes que estão sendo selecionadas e tornando-se problema em algumas lavouras do Rio Grande do Sul e Paraná (FERREIRA et al., 2009). Em áreas com uso frequente de glyphosate, como em soja geneticamente modificada (RR), áreas de cafezais e de pomares, tem havido seleção de espécies tolerantes a este herbicida (CHRISTOFFOLETTI et al., 2008).

A tolerância de plantas daninhas a herbicidas, assim como a resistência, tem levado sérios prejuízos aos produtores, relacionados principalmente, ao aumento de gastos para se tentar o controle de infestações nas áreas agrícolas, perdas significativas na produtividade em áreas onde não se consegue controle eficiente dessas populações de plantas daninhas problema (FERREIRA et al., 2009). Também apresentam aumento no impacto ambiental, pois dependendo da formulação do herbicida e doses usadas, pode ser uma fonte de contaminação de diferentes compartimentos ambientais, como água, ar e solo, não somente pontualmente, ou seja, nos locais em que forem aplicados, mas também em áreas

adjacentes, podendo atingir áreas distantes do ponto de sua aplicação (KARAM et al., 2009).

2.3 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA EM PLANTAS DANINHAS

Para que um herbicida exerça sua ação fitotóxica, é necessário que ocorra adequada deposição da calda no alvo, penetre na planta até atingir o citoplasma vivo da célula, para então exercer seu efeito (de contato), ou serem translocados para os pontos em que irá atuar (sistêmicos). Glyphosate é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica, empregado no controle de plantas daninhas anuais e perenes, não apresentando atividade residual no solo (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998). O herbicida glyphosate é aplicado em pós-emergência e, para apresentar eficiência, é necessário que ocorra a retenção da molécula na superfície foliar, penetração foliar, translocação na planta até o sítio de ação e a inibição da enzima-alvo enolpiruvilshiquimato-P-sintetase (EPSPs) (KIRKWOOD; MCKAY, 1994).

Existem diversos mecanismos que podem conferir tolerância de plantas daninhas aos herbicidas, podendo influenciar negativamente a ação destes compostos. Destacam-se a menor absorção e/ou translocação do herbicida, maior metabolização do herbicida a substâncias menos fitotóxicas, sequestro ou compartimentalização das moléculas intactas dos herbicidas, alteração no sítio de ação do herbicida, além de super expressão da enzima-alvo (SILVA et al., 2007; GALON et al., 2009).

2.3.1 Absorção

A retenção das gotas pulverizadas da calda de herbicida depositada na superfície foliar é essencial para a eficácia dos produtos aplicados em pós-emergência, entretanto, para atingir eficiência no controle de plantas daninhas é necessário que ocorra a penetração do mesmo nos tecidos vegetais (PROCÓPIO et al., 2003). Herbicidas aplicados em pós-emergência, como o glyphosate, penetram

através de estruturas aéreas, como folhas, caule, flores e frutos (SILVA et al., 2007).

A absorção e translocação do glyphosate são influenciadas por diversos fatores, entre eles, hábito de crescimento da daninha, área foliar, arranjo e ângulo foliar, cerosidade e pilosidade da folha, tensão superficial da gotícula, volume de solução/área e tamanho de gota, características das plantas alteradas pelo ambiente (VIDAL, 2002). A utilização de adjuvantes eleva a eficácia de glyphosate, pelo aumento da retenção de gotas na folha e da absorção foliar, aumentando a hidratação da cutícula e incrementando a difusão de glyphosate através desta (RUITER et al., 1992; KRUSE et al., 2000).

A absorção de herbicidas é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos herbicidas, pela disponibilidade dos produtos nos locais de absorção, pela composição da superfície das plantas e por fatores ambientais (temperatura, luz, umidade do solo e do ar), os quais influenciam também a translocação destes até o local de ação.

A quantidade e a composição da cera epicuticular podem variar com a espécie, cultivar e até mesmo dentro da mesma população. As plantas estão sujeitas a uma ampla variedade de estresses abióticos, e sua camada de cera cuticular proporciona uma barreira de proteção (SHEPHERD; GRIFFITHS, 2006). As ceras epicuticulares constituem o primeiro componente básico da membrana cuticular. As ceras podem ser amorfas, ou seja, formam uma fina película sobre a membrana cuticular, ou podem apresentar cristais de diferentes formas e tamanhos, essa característica depende da espécie e da composição química das ceras (MONQUERO; HIRATA, 2014).

A composição química das ceras consiste essencialmente em compostos de hidrocarbonetos de cadeia longa, incluindo alcanos, álcoois primários, aldeídos, álcoois secundários, cetonas, ésteres e outros compostos derivados (SHEPHERD; GRIFFITHS, 2006).

A espessura da cutícula das folhas e a sua composição química, podem dificultar a penetração na planta de certos herbicidas, enquanto facilita a penetração de outros. Isso depende principalmente do Kow (coeficiente de partição octanol/água) e da característica de ionização do herbicida (SILVA et al., 2007).

O conhecimento nas características de polaridade (polar ou apolar) dos

herbicidas é de suma importância para ter conhecimento da rota de absorção dos mesmos. Herbicidas apolares são absorvidos pela rota lipofílica, entretanto, os herbicidas polares, pela rota hidrofílica. A molécula do glyphosate é altamente polar e apresenta baixa lipofilicidade, com um coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) próximo a -4. Devido a estas características, é possível que a passagem do glyphosate da superfície da folha para o apoplasto ocorra em função de um caminho aquoso ou hidrofílico, através da cutícula lipofílica (CASELEY; COUPLAND, 1985). Devido às diferenças de constituição da maior parte das ceras epicuticulares (lipofílicas) e do glyphosate (hidrofílico), as ceras ganham mais importância já que, segundo Oliveira Jr. e Bacarin (2011), as ceras epicuticulares constituem, com certeza, a barreira mais significativa para a absorção via foliar de formulações de herbicidas com caráter hidrofílico. Em alguns casos, apenas 6% do total de glyphosate aplicado é absorvido.

A presença de água, além de favorecer a rota hidrofílica atua também na rota lipofílica, pois quando a parede celular composta por pectina e celulose é hidratada, ocorre o afastamento das placas de ceras, permitindo assim maior permeabilidade e conseqüentemente maior absorção do herbicida (SILVA et al., 2000).

A cutícula é primariamente apolar, mas existem diferenças com relação ao grau de hidrofobicidade devido à sua composição. Essas diferenças podem refletir na absorção do glyphosate, resultando em menor eficiência do produto quando a cutícula for mais hidrofóbica (CHACHALIS et al., 2001). As ceras epicuticulares apresentam importância na absorção dos herbicidas, devido a isso, vários trabalhos relatam que a quantidade e composição das ceras epicuticulares podem ser a principal barreira de absorção e subsequente translocação de herbicidas aplicados na folhagem de plantas daninhas (HATTERMAN-VALENTI et al., 2006).

A biossíntese da cutícula é muito sensível as condições ambientais, entre elas, quantidade de umidade do solo. A mudança da alta para baixa umidade do solo pode desencadear elevação na produção de ceras, ou seja, ocorre espessamento da cutícula durante condições desfavoráveis ao crescimento da planta. Várias espécies têm demonstrado aumento da quantidade de ceras

epicuticulares em resposta ao estresse hídrico e temperaturas altas (JEFFERSON et al., 1989; MCWHORTER, 1994; PREMACHANDRA et al., 1992; HATTERMAN-VALENTI et al., 2006; HATTERMAN-VALENTI et al., 2011).

Em estudo anatômico realizado com as espécies *G. parviflora*, *C. incana*, *C. bonariensis* e *I. cairica*, Procópio et al. (2003) observaram que *C. incana* apresentou como principal obstáculo foliar potencial à penetração de herbicidas o alto teor de cera epicuticular, enquanto em *I. cairica* a grande espessura da cutícula e baixa densidade estomática na face adaxial, além do alto teor de cera epicuticular foram os prováveis obstáculos constatados a penetração de herbicidas.

Em estudo realizado para avaliar a absorção e translocação de glyphosate em *Ipomoea lacunosa*, *Echinochloa crus-galli* e *Sida spinosa*, Norsworthy et al. (2001) verificaram que apenas 6% do glyphosate aplicado nas folhas de *Ipomoea lacunosa* foi absorvido 48 horas após o tratamento (HAT), enquanto que em *Echinochloa crus-galli* e *Sida spinosa* absorveram 33 e 22% respectivamente, sugerindo que a tolerância ao glyphosate seja devido a absorção limitada desse herbicida. As espécies *Ambrosia artemisiifolia*, *Echinochloa colona*, *Chenopodium album*, *Ipomoea lacunosa*, *Xanthium strumarium*, *Camelina microcarpa*, *Setaria viridis*, *Hordeum vulgare*, *Avena fatua*, *E. crus-galli* e *Convolvulus arvensis* apresentaram baixa absorção de glyphosate em levantamento realizado por Sammons; Gaines (2014) para evidenciar as causas de tolerância ou resistência ao glyphosate em plantas daninhas.

2.3.2 Translocação

Uma vez que o glyphosate penetra na planta, é necessário que ocorra a translocação, através de tecidos vasculares, para os sítios-alvo do herbicida (SATICHIVI et al., 2000). Quanto à sua translocação, os herbicidas podem ser divididos em móveis e imóveis. Aqueles móveis translocam-se através da corrente transpiratória e/ou assimilatória. Podem mover-se a pequenas ou grandes distâncias (das folhas para as raízes, vice-versa, ou permanecerem próximo do local de aplicação). A translocação representa um processo essencial para a eficácia do herbicida (WANAMARTA; PENNER, 1989).

Herbicidas que possuem ($\log K_{ow} < 0$), apresentam alta polaridade e forte ionização ($pK_a < 2$), como é o caso do glyphosate ($\log K_{ow} = -2,77$ à $-3,22$), são móveis pelo floema, embora quantidades importantes se movam pelo apoplasto (xilema) (RODRIGUES, 2009). A movimentação no floema segue a rota dos assimilados da fotossíntese oriundos das folhas fotossinteticamente ativas (fonte) em direção às partes das plantas em crescimento (dreno), para manutenção do metabolismo e/ou formação de produto de reserva, das raízes, dos tubérculos, das folhas jovens e de zonas meristemáticas (HETHERINGTON et al., 1998). Portanto, a absorção, translocação e metabolização do herbicida podem afetar a sensibilidade de uma planta, pois este necessita atingir o sítio de ação numa concentração adequada para apresentar eficiência.

O processo de translocação de herbicidas em plantas pode estar relacionado com a idade e/ou estágio de desenvolvimento, ou seja, plantas jovens tendem a dirigir os fotoassimilados para folhas jovens e para regiões de divisão celular e crescimento garantindo um bom controle, entretanto, após o florescimento, a distribuição prioriza as inflorescências (VIDAL, 2002).

Em espécies daninhas, a translocação reduzida é uma causa importante do controle insatisfatório. A translocação reduzida traz como consequência a incapacidade do herbicida em alcançar o local de ação, após ter penetrado na planta. Geralmente existem diferenças marcantes de translocação entre herbicidas e, para um mesmo produto, há diferenças entre espécies de plantas (AGOSTINETTO; VARGAS, 2009).

Em estudo realizado com o objetivo de caracterizar a absorção foliar, translocação e a metabolização do ^{14}C -glyphosate em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*, Monquero et al. (2004) observaram que o mecanismo de tolerância de *C. benghalensis* ao glyphosate são a absorção diferencial e a metabolização do herbicida pela planta. Em *I. grandifolia* a tolerância ocorre devido a uma menor translocação do herbicida, não havendo evidências de metabolização diferencial do herbicida por esta planta daninha.

Em *Chloris elata*, Brunharo et al. (2016) evidenciaram biótipos com absorção reduzida e maior retenção foliar de glyphosate, atribuindo-lhe um fator de resistência de 5,4. A espécie *Conyza bonariensis* também possui a translocação

diferencial como mecanismo de resistência ao glyphosate, sendo observado o acúmulo de glyphosate nas folhas tratadas dos biótipos resistentes (FERREIRA et al., 2008; CARDINALI et al., 2008).

Para a espécie *Lolium rigidum* resistente ao glyphosate evidenciou-se reduzida translocação (YU et al., 2009). Estudo realizado por Ghanizadeh et al. (2016), observaram que a espécie *Lolium perenne* apresentou como mecanismo de resistência ao herbicida glyphosate a menor translocação.

Os mecanismos que conferem resistência a *Digitaria insularis* estão relacionados à mais lenta absorção de glyphosate por plantas do biótipo resistente e a translocação é menor em plantas do biótipo resistente em relação ao suscetível, mesmo em plantas novas, com 3 a 4 folhas (CARVALHO et al., 2011).

Estudo desenvolvido com biótipos de *Raphanus raphanistrum* para avaliar qual mecanismo estava influenciando a resposta negativa ao controle com o herbicida 2,4-D, verificaram que essa espécie apresentou translocação reduzida do herbicida (GOGGIN et al., 2016).

2.3.3 Metabolização

Para que um herbicida atinja sua eficiência agrônômica é necessário que seja absorvido, translocado e que não seja metabolizado, e que atue em determinado local da célula que interfira na sobrevivência da planta (VIDAL, 2002). A metabolização é uma das principais formas de a planta detoxificar um composto externo, ou seja, uma planta daninha com a capacidade de degradar rapidamente um herbicida pode potencialmente inativá-lo antes que ele possa chegar ao seu local de ação na planta (BURHLER, 2013).

O processo de metabolização nas plantas ocorre em quatro fases distintas (COLE, 1994). Na primeira fase ocorre alteração na estrutura química do herbicida causada por reações de oxidação, redução e hidrólise. Na segunda fase, conhecida como conjugação, muitos herbicidas são rapidamente conjugados com açúcar por ponte glicosídica sendo este processo catalisado pela glicosiltransferases. Os herbicidas também podem ser conjugados a glutathione pela glutathione-S-transferase, resultando, assim, em conjugados menos fitotóxicos e mais

solúveis em água. Na terceira fase, conhecida como compartimentalização, ocorre o transporte do herbicida para dentro do vacúolo ou matriz extracelular. Na quarta e última fase há o processamento completo desses compostos. Geralmente, a capacidade metabólica é regulada por diversos genes, o que diminui a chance de desenvolvimento desse tipo de mecanismo de tolerância e/ou resistência (KISSMANN, 2003).

Para o herbicida glyphosate, o principal metabólito é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que foi identificado em algumas espécies que apresentam tolerância natural a este herbicida, como *Agropyron repens* e *Equisetum arvense* (COUPLAND, 1985; DYER, 1994). A espécie *Digitaria insularis* apresentou como um dos mecanismos de resistência a rápida metabolização do glyphosate em AMPA, glioxilato e sarcosina (CARVALHO et al., 2011).

2.3.4 Sequestro ou compartimentalização do herbicida

O sequestro ou compartimentalização do herbicida ocorre pela capacidade que as plantas possuem em sequestrar os herbicidas sem que uma concentração suficiente para que ocorra o controle alcance o local de ação. Estas baixas concentrações podem ocorrer por causa da retenção do herbicida pela superfície foliar, redução da absorção e/ou translocação na planta, ou pela ocorrência de fenômenos de sequestração no vacúolo, ou ainda, pelo aprisionamento na parede celular, impedindo sua atividade e translocação (CHRISTOFFOLETI et al., 2008; READE et al., 2004). Um dos casos mais conhecidos de plantas daninhas resistentes que possuem o sequestro do herbicida pelo vacúolo como mecanismo de resistência ao herbicida é a buva (*Conyza* spp.) (GE et al., 2009).

A resistência ao herbicida paraquat pode ser conferida pela compartimentalização das moléculas herbicidas na cutícula, na parede celular e no vacúolo, evitando seu acesso ao local de ação (HART & DI TOMASO, 1994). Em *Lolium rigidum* foi observado sequestro do herbicida paraquat pelo vacúolo (YU et al., 2010). As espécies *Conyza canadensis* (GE et al., 2010; GE et al., 2014) e *Lolium* spp. (GE et al., 2012) apresentaram compartimentalização de glyphosate.

2.3.5 Alteração no sítio de ação do herbicida

Os herbicidas possuem um local específico de atuação dentro da planta, conhecido como sítio específico ou sítio alvo de ação, ligando-se a uma enzima ou proteína, promovendo sua ação herbicida. Se este local específico de atuação for alterado, o herbicida já não se liga ao local de ação e é incapaz de exercer seu efeito fitotóxico (VOLENBERG; STOLTENBERG, 2002; SAMMONS; GAINES et al., 2014).

Casos de resistência por alteração no local de ação são provocados por alterações a nível de DNA, através da alteração de uma ou mais bases nitrogenadas do gene da enzima, dando origem a uma enzima modificada, impedindo a ligação do herbicida, perdendo totalmente sua funcionalidade (AGOSTINETTO & VARGAS, 2009). Alteração de uma única base nitrogenada, resulta em mutação de ponto, podendo gerar uma enzima com características funcionais diferentes da original (AGOSTINETTO & VARGAS, 2009).

Este tipo de mecanismo apresenta menor interação com o ambiente (VIDAL & MEROTTO Jr., 2001). Estudo desenvolvido por Lamego et al. (2009) com biótipos de *Bidens pilosa* resistentes aos inibidores da enzima ALS, provenientes de lavouras de soja de Goiás - BR, observaram que essa resistência está relacionada devido à mutação Trp574Leu no gene da enzima. Estudo realizado por González-Torralva et al. (2014), evidenciaram alteração na sequência do local alvo do gene EPSPS2 Pro-182-Thr, no biótipo resistente. Carvalho et al. (2012) evidenciou alteração dos aminoácidos nas posições 182 e 310 da enzima EPSPS em plantas de *Digitaria insularis* resistente. Mutação no aminoácido Pro106 da enzima EPSPS foi observado em populações resistentes de *Lolium rigidum* da Austrália (WAKELIN; PRESTON, 2005) e do Chile (PEREZ-JONES et al., 2005), em geral, a mutação no aminoácido Pro106 faz com que as plantas resistentes apresentem níveis moderados de resistência.

2.3.6 Superexpressão da enzima-alvo

Esse mecanismo de resistência é um dos mais recentemente

descobertos. A super-expressão da enzima alvo é conhecido pela presença de diversas cópias da sequência de DNA que codificam a expressão gênica de síntese da enzima relacionada à ação do herbicida, ou seja, se a enzima-alvo em que o herbicida funciona é sintetizada inúmeras vezes, o herbicida não causa a morte da planta, uma vez que a dose utilizada é insuficiente para inibir todas essas cópias (BORGATO; NETTO, 2016).

Foi relatada a primeira vez por Gaines et al. (2010), onde verificaram que o número de cópias do gene EPSPS na população suscetível variou apenas de 1 a 1,3 vezes, enquanto que a variação do biótipo resistente de 5 até 160 vezes em *Amaranthus palmeri*. Lorentz et al. (2014) evidenciaram que todas as populações resistentes ao glyphosate possuíam aumento no número de cópias do gene EPSPS, ficando evidente o mecanismo de ação dessa população de *Amaranthus tuberculatus*. Esse mecanismo de resistência foi evidenciado também em *Amaranthus tuberculatus* (CHATAM et al., 2015), *Lolium perenne* (SALAS et al., 2012) e *Kochia scoparia* (JUGULAM et al., 2014) ambos resistentes ao glyphosate.

2.4 TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES AO GLYPHOSATE

O glyphosate é o herbicida mais utilizado mundialmente, em função do baixo preço pago pelos produtores, elevada eficiência e da ampla e rápida adoção de culturas geneticamente modificadas (CGM) com resistência ao glyphosate pelos agricultores. Atualmente, o maior risco na adoção de CGM no Brasil e América do Sul deve-se à seleção de plantas daninhas com resistência e tolerância a herbicidas (CERDEIRA et al., 2010).

Modificações na composição de populações de espécies daninhas emergidas e no banco de sementes em função da utilização intensiva de glyphosate tem sido documentada em vários países (CERDEIRA et al., 2007; CERDEIRA et al., 2010; WEBSTER; NICHOLS, 2012). No Brasil, a intensificação do uso de glyphosate tem resultado em seleção interespecífica de algumas espécies de plantas daninhas (DURIGAN et al., 1988; SANTOS et al., 2001; MONQUERO, 2003; GALON et al., 2013), como a trapoeraba (*Commelina* spp.), corda-de-viola (*Ipomoea* spp.), poaia-branca (*Richardia brasiliensis*), erva-de-touro (*Tridax procumbens*) e erva-que

(*Borreria latifolia*). Entretanto, a razão para essa tolerância diferencial entre espécies não está totalmente elucidada. Nos Estados Unidos, as espécies *Ambrosia artemisiifolia* (KAPUSTA et al., 1994) e *Sesbania exaltata* (JORDAN et al., 1997), e na Argentina, as espécies *Ipomoea* spp., *Parietalia debilis*, *Petunia auxiliares*, *Verbena litoralis*, *Verbena bonariensis*, *Hybanthus parviflorus*, *Iresine difusa* e *Commelina erecta* (PAPA et al., 2002) tem sido referidas como tolerantes ao glyphosate.

A resposta de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* ao herbicida glyphosate é bem documentada na literatura. Estas espécies são referidas como tolerantes ao glyphosate (DURIGAN et al., 1988; SHARMA; SINGH, 2001; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; LACERDA; VICTORIA FILHO, 2004; MONQUERO et al., 2005; PROCÓPIO et al., 2007; VARGAS; GAZZIERO, 2008; CERDEIRA et al., 2010).

Muitos trabalhos publicados mostram que existe grande variabilidade em relação ao controle de espécies daninhas com o uso do herbicida glyphosate. Lacerda; Victoria Filho (2004), afirmam que biótipos podem apresentar níveis diversos de resistência, considerando que ocorre resistência quando um biótipo resiste a duas vezes ou mais a dose que normalmente controla os biótipos suscetíveis. Em alguns casos, essa resistência é quebrada com aumento de dose, em outros não.

Doses acima de 720 g i.a. ha⁻¹, são necessárias para se conseguir um controle próximo a 90% em *D. insularis* e *Spermacoce latifolia* (sin. *Borreria latifolia*), indicando que essas espécies apresentaram sensibilidade intermediária às doses de glyphosate, pois com a dose de 1.440 g i.a. ha⁻¹ houve uma redução de crescimento expressiva (LACERDA; VICTORIA FILHO, 2004).

Para aplicações em plântulas de *S. latifolia* com 1-3 e 4-6 folhas na dose de 960 g i.a. ha⁻¹, obteve-se 81, 25 e 100% de controle, respectivamente (RAMIRES et al., 2011). No trabalho realizado por Zarpellon et al. (2012), o controle de *S. latifolia* atingiu 66% com uma dose de 2880 g i.a. ha⁻¹ aos 21 DAT, sendo que os autores ainda relatam que ocorreu rebrote a partir desta avaliação.

Martins (2008), trabalhando com a espécie *Borreria densiflora*, mesmo gênero de *B. latifolia*, atingiu 87,5% de controle com 1080 g i.a. ha⁻¹. Porém, a

autora faz uma observação no seu trabalho, que pode ser extrapolada, para os demais trabalhos citados aqui. Observou-se que a aplicação dos herbicidas no seu experimento (assim como nos demais) ocorreu quando as plântulas estavam com no máximo 3 pares de folhas, sendo que observações preliminares de aplicações pós-emergentes evidenciaram que a planta daninha se torna tolerante quando apresenta a fenologia de 4-5 pares de folhas, levando então, ao insucesso no controle pelos herbicidas. Isso provavelmente pode ser extrapolado para outros trabalhos que avaliam a resposta a doses de glyphosate para esta espécie.

Neste contexto, as misturas em tanque com glyphosate ou aplicações sequenciais com herbicidas de outros mecanismos de ação representam uma importante estratégia para o controle dessa planta daninha.

A revisão de literatura efetuada indica variabilidade de controle de *R. brasiliensis* com glyphosate, pois enquanto muitos trabalhos sinalizam a dificuldade de controle desta planta daninha com este herbicida, alguns indicam níveis de controle satisfatórios com o uso de glyphosate.

O uso isolado de glyphosate (sem associações e adjuvantes) na dose 770 g i.a. ha⁻¹ para o controle de *R. brasiliensis* apresentou baixa eficiência, tendo atingido no máximo 14% de controle, quando o mesmo foi aplicado isoladamente (SHARMA; SINGH, 2001). Resultados semelhantes foram observados por Cechin et al. (2012), que obtiveram um controle de 17% aos 21 DAT, com 2880 g i.a. ha⁻¹ de glyphosate.

Em um experimento com doses crescentes de glyphosate Correia; Durigan (2010), não observaram controle satisfatório para as plantas daninhas avaliadas, dentre elas, a *R. brasiliensis* sendo consideradas como “escapes”.

O glyphosate utilizado isoladamente controlou a planta daninha *Richardia brasiliensis* em 60% aos 7 DAT e 90% aos 14 DAT (MONQUERO et al. 2001). Já em outro estudo de Monquero et al. (2005), os biótipos de *R. brasiliensis* não foram controlados, mesmo com as doses de 2160 g e.a. ha⁻¹, sendo atingido um controle próximo a 75% aos 28 DAT.

Controle de 99,5% em *Richardia brasiliensis* aos 28 DAT com 720 g i.a. ha⁻¹ de glyphosate, sendo o mesmo inclusive superior em nível de controle aos demais herbicidas alternativos testados (VITORINO et al. 2012). Em um trabalho

com *Richardia scabra* (mesmo gênero de *R. brasiliensis*), Reddy; Singh (1992), obtiveram um nível de controle maior que 94% com 500 e 1000 g i.a. ha⁻¹.

2.5 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD NA DETECÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DANINHAS

O avanço da engenharia genética trouxe solução para muitas pesquisas possibilitando a elucidação de muitos problemas. Na agronomia a aplicação da biotecnologia é de suma importância para áreas como a fruticultura, zootecnia, fitotecnia e a fitossanidade, tanto para o melhoramento genético, como na determinação das causas de distúrbios, similaridade genética, regulação de genes e transformação genética (ZANATTA; ZANATTA, 2012). A biologia molecular vem se tornando uma importante ferramenta nos estudos com plantas daninhas, possibilitando desvendar possíveis casos de resposta diferencial entre biótipos da mesma espécie à determinado herbicida.

Uma das características inerentes às plantas daninhas é a grande diversidade genética (VIDAL; MEROTTO JÚNIOR, 2001), considerado um processo de evolução natural da espécie derivado principalmente da variação mendeliana, da hibridação interespecífica e da poliploidia (WINKLER, 2002).

As técnicas moleculares, como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), reação da polimerase em cadeia - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) são bastante recomendadas, pois permitem estimar a variabilidade genética intraespecífica e interespecífica em espécies de plantas daninhas. Essas técnicas supracitadas servem como ponto de partida para estudos de manejo para essas plantas daninhas, pois, aliadas ao sequenciamento permitem localizar genes de resistência, bem como possíveis mutações relacionadas ao surgimento de indivíduos resistentes (VIEIRA, 2007).

Os marcadores moleculares RAPD são uma variação da técnica de PCR, com duas características distintas, sendo elas, a utilização de um oligonucleotídeo iniciador único ao invés de um par de oligonucleotídeos e o oligonucleotídeo único tem sequência arbitrária, portanto sua sequência alvo é

desconhecida, sendo empregada em estudos para caracterização genética de espécies quando se desconhecem maiores informações genéticas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares RAPD permitem caracterizar plantas e microrganismos e avaliar a diversidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie ou de diferentes espécies (WILLIAMS et al., 1990).

A técnica de RAPD tem sido bem difundida para análise da variabilidade genética envolvendo plantas daninhas. Muitos trabalhos já foram realizados para avaliar variabilidade genética com diversas espécies, entre elas, *Commelina benghalensis* (VIEIRA, 2003), *Poa annua* L. (SWEENEY, DANNEBERGER, 1995), *Echinochloa crus-galli* (RUTLEDGE et al., 2000) *Sinapsis arvensis* (MOODIE et al., 1997), *Euphorbia esula* (ROWE et al., 1997), *Euphorbia heterophylla* (WINKLER et al., 2003), *Bidens pilosa* (VIDAL et al., 2005); *Bidens pilosa* (LAMEGO et al., 2006), entre outros.

Resultados de estudos com marcadores moleculares são de suma importância para viabilizar as técnicas de controle químico, como detectar possíveis biótipos com maior tolerantes e/ou resistentes a determinado herbicida, além de possibilitar estimar a variabilidade genética intraespecífica e interespecífica existente em determinadas populações, facilitando ou contribuindo para o manejo (VIEIRA, 2007).

2.6 COMPETIÇÃO DE PLANTAS DANINHAS COM A CULTURA DA SOJA

A ocorrência de plantas daninhas tem sido apontada como um dos fatores mais importantes que contribuem para a redução do rendimento das culturas, constituindo-se grande ameaça à produção sustentável de alimentos. Ao nível mundial, as perdas médias reais ocasionadas pela interferência das plantas daninhas atingem 4,3 a 15,2% do rendimento das culturas de algodão, arroz, batata, milho, soja e trigo, mesmo com a adoção de medidas de controle (OERKE, 2006).

A cultura da soja apresenta interações negativas com a presença de plantas daninhas, sendo essas, consideradas de grande importância durante o desenvolvimento da cultura. As interações negativas podem dar-se por fatores

abióticos (disponibilidade de água e nutrientes, pH do solo, luminosidade, entre outros) ou bióticos, destacando-se a interferência das plantas daninhas sobre as plantas cultivadas em decorrência da competição por luz, nutrientes, água, entre outros, podendo também atuarem como hospedeiras de pragas e doenças (PITELLI; MARCHI, 1991). As perdas no cultivo da soja provocada pela interferência de plantas daninhas podem chegar a 100% em determinadas regiões, quando não manejada adequadamente (GAZZIERO et al., 2004).

A intensidade da interferência entre plantas daninhas e cultivadas é determinada à medida que se verifica o decréscimo da produção da cultura quando exposta a competição, dependendo da época e da duração da convivência (PITELLI, 1985). Através da convivência de plantas daninhas com as culturas, pode-se determinar o nível de dano competitivo, nível crítico de dano e nível de dano econômico.

O nível de dano competitivo é determinado quando detectado um impacto negativo da presença de plantas daninhas convivendo juntamente com a cultura (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007), ou ainda mensurado através de testes de interferência o efeito depressivo das infestantes no rendimento da cultura (CUSSANS; COUSENS; WILSON, 1986).

As perdas de rendimento de grãos devido à competição de plantas daninhas variam com as espécies de infestantes. Entre as espécies de ocorrência comum em lavouras de soja das diferentes regiões do Brasil, destacam-se plantas da família Rubiaceae representada principalmente pelas espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis*.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da interferência de plantas daninhas, entre elas, *Richardia brasiliensis* e *Borreria latifolia* em diferentes níveis de infestação sobre as características agrônomicas e a produtividade de soja transgênica geneticamente modificada, Pittelkow et al. (2009) verificaram que a presença de plantas daninhas reduziu a formação dos trifólios e o acúmulo de massa seca ao longo do ciclo da soja, sendo maiores os danos conforme se aumentaram os níveis de infestação de plantas daninhas.

Estudo desenvolvido por Benedetti et al. (2009) com o objetivo de determinar o período anterior à interferência das plantas daninhas, entre elas,

Richardia brasiliensis com a cultura da soja, observaram que a cultura conviveu com a comunidade infestante até 25 dias após o plantio, sem interferir significativamente na produtividade. Os mesmos verificaram ainda que a interferência de plantas daninhas com a soja diminuiu o potencial produtivo da cultura em 30%.

3 TOLERÂNCIA AO GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE *Borreria latifolia* E *Richardia brasiliensis*

RESUMO

Com o aumento do uso de glyphosate na cultura da soja nos últimos anos, provocou a seleção de biótipos de *B. Latifolia* e *R. brasiliensis* com maior tolerância a esse herbicida. O presente trabalho objetivou avaliar os níveis de tolerância ao herbicida glyphosate em biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum e *Richardia brasiliensis* Gomes por meio de curvas de dose-resposta. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foram avaliados 14 biótipos de *B. latifolia* (1º estudo) e 11 biótipos de *R. brasiliensis* (2º estudo) coletados em lavouras de soja do Paraná e Santa Catarina. Para estes experimentos as doses de glyphosate utilizadas foram de 0, 74, 163, 360, 792 e 1742 g ha⁻¹ de e.a., aplicadas quando as plantas estavam com 6 a 8 folhas totalmente expandidas. Foram determinados os níveis de controle aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA), e da massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) aos 28 DAA. Os resultados do presente estudo indicam variabilidade de resposta ao glyphosate entre os biótipos coletados. Os biótipos de *B. latifolia* 277, 283 e 300 e os biótipos de *R. brasiliensis* 283, 285 e Papanduva não foram controlados com doses de glyphosate acima da usualmente utilizada nas lavouras (720 g ha⁻¹ de e.a.), evidenciando seleção pelo uso repetitivo do herbicida glyphosate. Os fatores de tolerância variaram entre 1,1 a 4,1 e 2,8 a 8,1, respectivamente, para *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. De uma forma geral, os níveis de tolerância apresentados pelos biótipos de *R. brasiliensis* foram superiores aos biótipos de *B. latifolia*. Os resultados encontrados apontam uma relação positiva entre a dificuldade de controle de alguns biótipos de ambas as espécies estudadas com o período de utilização de glyphosate nas áreas agrícolas.

Palavras-chave: Curva dose-resposta. Fator de tolerância. C₅₀. C₈₀. Rubiaceae. Poaia-branca. Erva-quente.

ABSTRACT

The increase of glyphosate use in the soybean crop in the last years caused the selection of *B. Latifolia* and *R. brasiliensis* biotypes with higher tolerance to this herbicide. The present work evaluated glyphosate herbicide tolerance levels in *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum and *Richardia brasiliensis* Gomes biotypes with dose-response curves. Two experiments were conducted in a greenhouse, in a completely randomized design, with four replications. Fourteen biotypes of *B. latifolia* (1st study) and 11 biotypes of *R. brasiliensis* (2nd study) were collected in soybean cultivated fields in the States of Paraná and Santa Catarina. In both experiments, the doses of glyphosate used were 0, 74, 163, 360, 792 and 1742 g ha⁻¹ of ea, applied when the plants attained 6 to 8 fully expanded leaves. Control levels were

determined at 14 and 28 days after application (DAA), and green aerial part (MPAV) and dry mass (MPAS) at 28 DAA. The results of the present study indicate variability of response to glyphosate among the collected biotypes. The biotypes 277, 283 and 300 of *B. latifolia* and 283, 285 and Papanduva of *R. brasiliensis* were not controlled with doses of glyphosate above the reference (720 g ha⁻¹ of ea), evidencing selection by glyphosate usage. Tolerance factors ranged from 1.1 to 4.1 and 2.8 to 8.1, for *B. latifolia* and *R. brasiliensis*, respectively. In general, the tolerance levels presented by *R. brasiliensis* biotypes were higher than by *B. latifolia*. The results showed a positive relationship between the difficulty of controlling some biotypes of both species with the usage of glyphosate in the agricultural areas.

Keywords: Dose-response curve. Tolerance factor. C₅₀. C₈₀. Rubiaceae. White-eye. Broadleaf buttonweed.

3.1 INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com 650 gêneros, e aproximadamente 13.000 espécies a nível mundial (DELPRETE, 1999). No Brasil, esta família compreende cerca de 130 gêneros e 1.500 espécies distribuídas em formações vegetais diferentes, com uma grande ocorrência na Mata Atlântica (SOUZA; LORENZI, 2005). O Brasil é um país com grande diversidade de espécies rubiáceas nativas ou introduzidas, muitas com elevado valor econômico como cafeeiro, ipecacuanha (medicinal), gardênia (ornamental), entre outras. Por outro lado, muitas espécies são infestantes (KISSMANN; GROTH, 1995).

Espécies infestantes da família rubiácea pertencentes aos gêneros *Borreria* (*Spermacoce*) e *Richardia* apresentam grande importância na região Sul do Brasil, especialmente em áreas cultivadas com a cultura da soja, onde são encontradas de forma generalizada.

O controle químico é um dos principais métodos empregados para o controle de plantas daninhas, entretanto, o uso intensivo e inadequado de herbicidas pode provocar efeitos negativos no ambiente, como a seleção de espécies daninhas tolerantes e resistentes aos diferentes mecanismos de ação herbicida existentes (FERREIRA et al., 2009).

A tolerância, também referida como resistência natural (Duke, 2011) é uma característica existente na espécie mesmo antes da aplicação do herbicida em

uma área (CHRISTOFFOLETI et al., 2008). Por outro lado, a resistência é a habilidade de uma planta sobreviver e se reproduzir, após exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biótipo selvagem da planta (HEAP, 2006). Mesmo sendo considerada uma característica da espécie mesmo antes do herbicida passar a ser utilizado, diferentes populações de plantas daninhas podem exibir reações distintas de tolerância a um determinado herbicida.

O glyphosate é o herbicida mais utilizado mundialmente, em função do baixo preço pago pelos produtores, elevada eficiência e da ampla e rápida adoção de culturas geneticamente modificadas (CGM) com resistência ao glyphosate pelos agricultores. Esse herbicida, vem sendo empregado no controle de plantas daninhas na dessecação antes da semeadura da cultura e pós-emergência em CGM. Atualmente, o mais alto risco na adoção de CGM no Brasil e América do Sul deve-se à seleção de plantas daninhas com resistência e tolerância a herbicidas (CERDEIRA et al., 2010). Em áreas com uso frequente de glyphosate, como em soja e milho geneticamente modificados (RR), áreas de cafezais e de pomares, tem havido seleção de espécies tolerantes a este herbicida.

Modificações na composição de populações de espécies daninhas emergidas e no banco de sementes, em função da utilização intensiva de glyphosate tem sido documentada em vários países (CERDEIRA et al., 2007; CERDEIRA et al., 2010; WEBSTER; NICHOLS, 2012). No Brasil, a intensificação do uso de glyphosate tem resultado em seleção interespecífica de algumas espécies de plantas daninhas (DURIGAN et al., 1988; SANTOS et al., 2001; MONQUERO, 2003; GALON et al., 2013), como a trapoeraba (*Commelina* spp.), corda-de-viola (*Ipomoea* spp.), poaia-branca (*Richardia brasiliensis*), erva-de-touro (*Tridax procumbens*) e erva-quente (*Borreria latifolia*). A razão para haver maior tolerância em algumas espécies do que em outras em alguns casos foi investigada, mas para muitas espécies ainda não está totalmente elucidada.

Muitos trabalhos publicados mostram que existe grande variabilidade de resposta de espécies daninhas ao glyphosate. A resposta de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* ao herbicida glyphosate tem sido documentada na literatura. Estas espécies são referidas como tolerantes ao glyphosate (DURIGAN et al., 1988; SHARMA; SINGH, 2001; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; LACERDA;

VICTORIA FILHO, 2004; MONQUERO et al., 2005; PROCÓPIO et al., 2007; VARGAS; GAZZIERO, 2008; CERDEIRA et al., 2010).

Espécies e/ou populações da mesma espécie daninha ou até mesmo um único biótipo, podem apresentar variabilidade quanto à tolerância a um herbicida. Para obter controle de aproximadamente 90% de *D. insularis* e *Spermacoce latifolia* (sin. *Borreria latifolia*), doses acima de 720 g i.a. ha⁻¹ são necessárias, indicando que essas espécies apresentaram sensibilidade intermediária às doses de glyphosate, pois com a dose de 1.440 g i.a. ha⁻¹ houve uma redução de crescimento expressiva (LACERDA; VICTORIA FILHO, 2004). Para aplicações em plântulas de *B. latifolia* com 1-3 e 4-6 folhas na dose de 960 g i.a. ha⁻¹, obteve-se 81 e 100% de controle respectivamente (RAMIRES et al., 2011).

Há grande variabilidade de controle de *R. brasiliensis* com glyphosate nos diversos estudos efetuados com a espécie. O glyphosate utilizado isoladamente na dose de 0,42 kg e.a. ha⁻¹ resultou em 90% aos 14 DAA (MONQUERO et al., 2001). Nível de controle de poaia branca de 99,5% aos 28 DAA com 720 g i.a. ha⁻¹ de glyphosate foi relatado por Vitorino et al. (2012), sendo superior aos demais herbicidas alternativos testados. Por outro lado, o uso isolado de glyphosate (sem associações com outros herbicidas ou adjuvantes) na dose 770 g i.a. ha⁻¹, apresentou baixa eficiência de controle de *R. brasiliensis*, atingindo apenas 14% (SHARMA; SINGH, 2001). Para confirmar a ocorrência da resistência ou tolerância diferencial, é recomendada a realização de curvas de dose-resposta, ou seja, através delas toma-se conhecimento da dose necessária para promover o controle de 50% da população (C₅₀) e a dose necessária para reduzir em 50% a produção de massa seca da população (GR₅₀) (GAZZIERO et al., 2009). Tomando conhecimento destas variáveis, é possível proceder com o cálculo do fator de resistência ou do fator de tolerância (FR ou FT), que se refere ao número de vezes que a dose é necessária para o controle da população resistente ou tolerante é maior do que a dose que causa o mesmo efeito na suscetível ou sensível (HALL et al., 1998).

Evidencia-se a necessidade de investigação o nível de tolerância para delinear estratégias de manejo para essas espécies problemas em áreas agricultáveis. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de tolerância ao glyphosate de biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* por meio de

curvas de dose-resposta.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação nas dependências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Pato Branco, entre os meses de janeiro e abril de 2014. As espécies empregadas foram *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. Os biótipos empregados em cada experimento e seus respectivos locais de coleta estão listados na Tabela 3.1. Os biótipos foram coletados em lavouras de soja (março à maio de 2013) com histórico de utilização do herbicida glyphosate e que apresentavam elevada infestação dos mesmos. Os biótipos sensíveis de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foram adquirido junto à empresa Cosmos Agrícola Ltda., de São Paulo/SP. O biótipo de *R. brasiliensis* 271 também foi considerado sensível por ter sido coletado em uma área sem histórico de utilização do herbicida glyphosate.

Foram aplicados questionários aos proprietários das áreas com problemas de infestação de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* onde foram realizadas as coletas de sementes, para obtenção de informações do histórico das áreas e manejo adotado pelos agricultores. Após a análise dos níveis de controle, os biótipos em negrito foram selecionados para apresentação dos resultados, por apresentarem respostas contrastantes ao glyphosate (Tab. 3.1).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Para *B. Latifolia* e *R. brasiliensis*, os experimentos foram arranjados em esquema fatorial 6 X 6 em que o primeiro fator foi representado pelos biótipos utilizados (Tab. 3.1) e o segundo fator pelas doses do herbicida glyphosate (0, 74, 163, 360, 792 e 1742 g e.a. ha⁻¹).

Tabela 3.1 – Identificação dos biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* empregados nos experimentos com seus respectivos locais de coleta. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Espécie	Identificação do Biótipo	Local da Coleta
<i>Borreria latifolia</i>	263	São João/PR
	277	Renascença/PR
	280	Renascença/PR
	283	Pato Branco/PR
	284	Pato Branco/PR
	285	Itapejara D´oeste/PR
	287	Itapejara D´oeste/PR
	296	Rio Bonito do Iguaçu/PR
	300	Mariópolis/PR
	302	Pato Branco/PR
<i>Richardia brasiliensis</i>	Donato	Canoinhas/SC
	Major Vieira	Major Vieira/SC
	Papanduva	Papanduva/SC
	São Paulo*	São Paulo – Cosmos Agrícola
	271	São João/PR
	277	Renascença/PR
	283	Pato Branco/PR
	285	Itapejara D´oeste/PR
	291	Nova Prata do Iguaçu/PR
	295	Rio Bonito do Iguaçu/PR
<i>Borreria latifolia</i>	Alvorada 2	Alvorada do Sul/PR
	Embrapa	Londrina/PR
	Major Vieira	Major Vieira/SC
	Papanduva	Papanduva/SC
	São Paulo – Cosmos*	São Paulo/SP

* Biótipo considerado como sensível ao herbicida glyphosate. Negrito: Biótipos com respostas contrastantes selecionados para apresentação nos resultados e discussão do presente capítulo.

As sementes de *B. latifolia* foram submetidas à superação de dormência com aquecimento a 60°C por 30 min e posterior imersão em nitrato de potássio 2% por 3 h. Já as sementes de *R. brasiliensis* não necessitam de superação de dormência. As sementes então foram colocadas para germinar em

caixas gerbox com dupla camada de papel de germinação umedecido com água destilada em BOD à 25°C com fotoperíodo 12/12 horas. Aproximadamente 15 dias após a germinação, em cada experimento foram transplantadas duas plântulas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* para vasos de polietileno com capacidade de 5 dm³ de solo do tipo Latossolo Vermelho distroférico. O solo foi coletado na área experimental da UTFPR, em área livre de propágulos de espécies rubiáceas, foi previamente peneirado, e 20 dias após o transplante, realizou-se o desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso focando em uniformidade entre as repetições. A irrigação foi realizada 3 vezes por semana com mangueira, irrigando próximo ao solo, proporcionando umidade ideal para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Quando as plantas estavam com seis a oito folhas totalmente expandidas, aplicou-se os tratamentos com glyphosate, com pulverizador costal pressurizado por CO₂ a 43 lbf/pol², contendo uma barra contendo três pontas do tipo leque 110.02, distanciadas entre si de 0,50m, totalizando volume de calda de 200 L ha⁻¹. As condições meteorológicas no início e final das aplicações foram as seguintes: temperatura do ar (T°C): 24 e 21,8; umidade relativa do ar (UR%): 84 e 88,6.

Aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos, foram realizadas avaliações de controle visual baseadas na escala proposta por Frans et al. (1986) em que 0 representa efeito nulo de sintomas de herbicidas sobre as plantas e 100% representa morte das plantas. Após a última avaliação (28 DAA), realizou-se a coleta da parte aérea das plantas, com posterior secagem das mesmas em estufa com circulação de ar forçada a 60°C, até atingir massa constante e a quantificação da massa seca da parte aérea (MPAS).

Os resultados de controle visual foram transformados para 100 – % de controle e a MPAV e MPAS foi expressa como percentual em relação à testemunha. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância dos resultados pelo teste F a 5% de probabilidade de erro com o auxílio do programa Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2005). A relação entre níveis de fator quantitativo e variáveis resposta foi ajustada por regressão não linear, com o auxílio do programa Sigmaplot 10.0. Por meio do modelo ajustado, foram calculados os valores de C₅₀ (dose necessária para atingir 50% de controle) e GR₅₀ (dose necessária para reduzir em 50% a MPAS).

Através dos parâmetros obtidos com o ajuste das equações pelo SigmaPlot, foram calculadas também o C_{80} ou GR_{80} , com o auxílio da planilha eletrônica Excel®.

Calculou-se o fator de tolerância (FT) por meio do quociente do C_{50} ou do GR_{50} de cada biótipo pelo C_{50} ou GR_{50} do biótipo mais sensível ao herbicida. Esse fator representa um índice comparativo do biótipo de maior tolerância, em relação ao biótipo de menor tolerância (HALL et al., 1998; DIAS et al., 2003). Realizou-se também a análise da correlação de Pearson entre os dados de controle e da MPAS com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as variáveis analisadas para a espécie *B. latifolia* e *R. brasiliensis* apresentaram significância entre os fatores biótipos x doses ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.1 Resposta de biótipos de *B. latifolia*

Aos 14 DAA, houve grande variabilidade de resposta dos biótipos de *B. latifolia* às doses de glyphosate empregadas (Fig. 3.1 A). Os níveis de controle dos biótipos 287, 277 e 300 para a dose 792 g e.a. ha^{-1} (dose superior à usada por muitos agricultores, de 720 g ha^{-1} de e.a.) foram os mais baixos, atingindo 41, 74 e 77%, respectivamente. As menores doses empregadas, de 74 e 163 g ha^{-1} de e.a., apresentaram baixos níveis de controle para todos os biótipos testados, proporcionando controle máximo de 45%. A dose de 360 g ha^{-1} de e.a. de glyphosate foi fortemente discriminadora, pois provocou diferenças de controle muito grandes entre os biótipos. Para esta dose, o biótipo São Paulo (sensível), apresentou aproximadamente 100% de controle, enquanto que os níveis de controle dos biótipos 283, 277 e 300 situaram-se entre 15 e 26%.

Aos 28 DAA observou-se considerável incremento no controle dos biótipos de *B. latifolia* testados (Fig. 3.1 B). Para as doses 792 e 1742 g ha^{-1} de e.a., o biótipo 287 apresentou menor controle, totalizando 74 e 95%, respectivamente. A

dose 360 g ha⁻¹ de e.a. novamente apresentou elevada capacidade discriminadora, ou seja, para o biótipo sensível houve aproximadamente 100% de controle, enquanto os biótipos 283, 277, 300 e 287 apresentaram níveis de controle de 36, 43, 44 e 70%, respectivamente. Os biótipos 277, 283, 287 e 300 destacaram-se por apresentarem maior tolerância ao glyphosate.

Os resultados supracitados evidenciam variabilidade de tolerância ao glyphosate entre os biótipos de *B. latifolia* coletados em diferentes locais do Paraná e Norte de Santa Catarina.

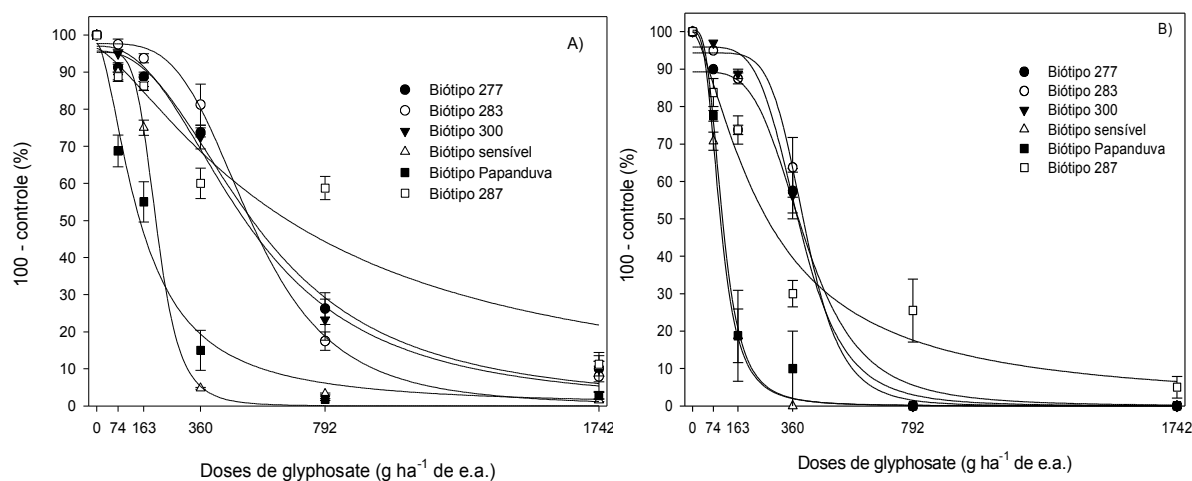


Figura 3.1 – Controle (100 – controle) de biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) em resposta às doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.

Análise da literatura especializada aponta que o controle de *B. latifolia* é variável, dependendo principalmente da dose de glyphosate empregada e do estágio de desenvolvimento das plantas. Estudo desenvolvido por Lacerda, Victoria Filho (2004) evidenciaram a necessidade de doses superiores a 720 g ha⁻¹ de i.a. para obter controle próximo a 90% para *B. latifolia*, evidenciando que essa espécie apresenta sensibilidade intermediária ao glyphosate. O emprego de 960 g ha⁻¹ de i.a. de glyphosate em plântulas de *B. latifolia* em estágio de desenvolvimento de 1-3 e 4-6 folhas resultaram em níveis de controle de 87 e 100% aos 35 DAA, respectivamente (RAMIRES et al., 2011), demonstrando a importância do estágio de desenvolvimento para se atingir bons níveis de controle. O controle de *B. latifolia* foi de apenas 66% com dose de 2880 g i.a. ha⁻¹ de glyphosate aos 21 DAA, havendo

rebrote a partir dessa avaliação (ZARPELLON et al., 2012).

Em relação aos valores de C_{50} ajustados pelo SigmaPlot, aos 14 DAA (Tab. 3.2), os maiores valores foram alcançados pelos biótipos 277, 283, 287 e 300 totalizando 560,87; 540,45; 702,31 e 527,80 g ha⁻¹ de e.a., respectivamente, enquanto o biótipo sensível apresentou apenas 208,79 g ha⁻¹ de e.a.. Em relação ao C_{80} , os mesmos biótipos destacaram-se, entretanto, o biótipo 287 apresentou um valor de C_{80} superior à maior dose testada no presente estudo, diferenciando-se dos demais. Os biótipos Papanduva e São Paulo apresentaram os menores valores de C_{80} , respectivamente, com valores de 350 e 269 g ha⁻¹ de e.a., respectivamente.

Tabela 3.2 - Parâmetros das equações ajustadas, C_{50} e C_{80} para o controle dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 14 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	Parâmetros ¹				C_{80} **
	A	B	X0(C_{50})*	R ²	
277	95,69	2,38	560,87	0,99	981
283	97,68	3,76	540,45	0,99	775
300	97,82	2,48	527,80	0,99	912
São Paulo ²	95,32	5,20	208,79	0,99	269
Papanduva	97,84	1,65	153,89	0,98	350
287	96,40	1,35	702,31	0,92	>1742

¹Equação logística de três parâmetros. ²Biótipo considerado sensível. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, C_{50} = Dose que proporciona 50% de controle, C_{80} = Dose que proporciona 80% de controle. *Valores ajustados pelo programa Sigmaplot. **Índice estimado por meio da planilha eletrônica Excel®.

Os biótipos 277, 283, 287 e 300 apresentaram os maiores valores de C_{50} ajustados pelo SigmaPlot, aos 28 DAA (Tab. 3.3), de 403,73; 405,16; 267,09 e 384,80 g ha⁻¹ de e.a., respectivamente, enquanto o biótipo sensível apresentou c_{50} de apenas 99,41 g ha⁻¹ de e.a., muito inferior aos demais. Do mesmo modo que evidenciado pelo C_{50} , destaca-se a tolerância elevada do biótipo 287, necessitando 709 g ha⁻¹ de e.a. para atingir 80% de controle, necessitando a dose usualmente empregada nas lavouras (720 g ha⁻¹ de e.a.). Entretanto, os biótipos São Paulo e Papanduva necessitaram aproximadamente de 160 g ha⁻¹ de e.a. para atingir 80% de controle.

Tabela 3.3 - Parâmetros das equações ajustadas, C_{50} , C_{80} e Fator de tolerância (FT) para o controle dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 28 DAA em resposta às doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	Parâmetros ¹				C_{80}^{**}	FT
	A	B	$X0(C_{50})^{**}$	R^2		
277	89,27	4,02	403,73	0,96	549	4,1
283	94,34	6,13	405,16	0,99	501	4,1
300	95,93	4,76	384,80	0,99	509	3,9
São Paulo ²	99,92	3,03	99,41	0,99	157	1
Papanduva	100,43	3,19	106,76	0,99	165	1,1
287	100,05	1,42	267,09	0,97	709	2,7

¹Equação logística de três parâmetros. ²Biótipo considerado sensível. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, C_{50} = Dose que proporciona 50% de controle, C_{80} = Dose que proporciona 80% de controle. *Valores ajustados pelo programa Sigmaplot. **Índice estimado por meio da planilha eletrônica Excel®.

Os resultados de MPAV e MPAS reforçam os dados apresentados para o controle visual, evidenciando elevada variabilidade de resposta ao glyphosate entre os biótipos de *B. latifolia* testados. Verifica-se elevada redução da MPAV e MPAS com o incremento das doses de glyphosate (Fig. 3.2).

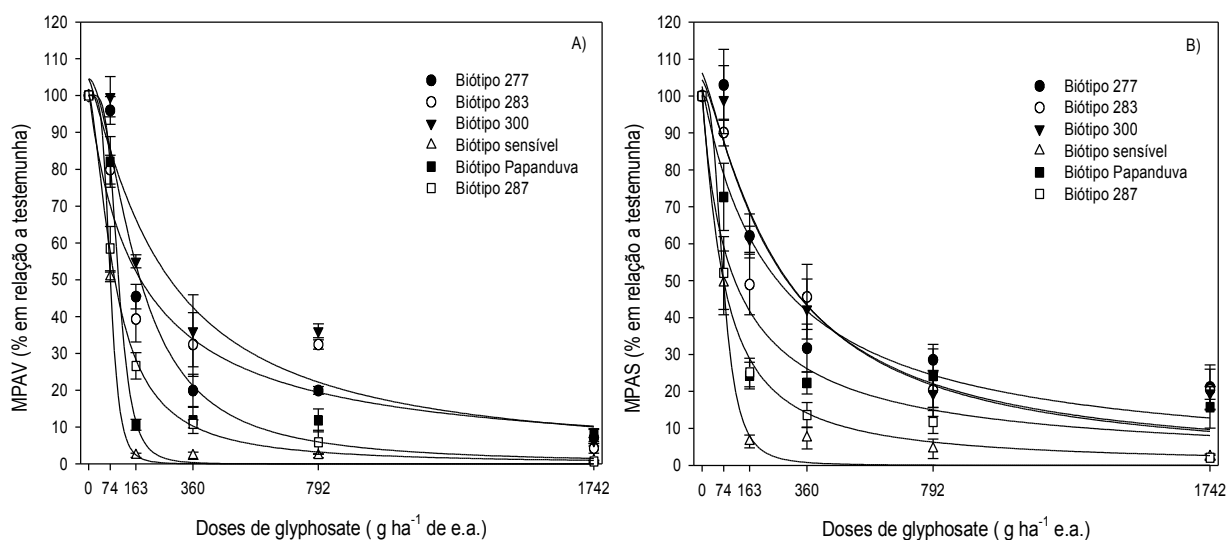


Figura 3.2 - Redução da massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) de biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 28 DAA em resposta às doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.

Os biótipos 277, 283 e 300 destacaram-se pelas menores reduções da MPAS, de 79, 79 e 81%, respectivamente com o emprego da maior dose de glyphosate (Fig. 3.2 B). No entanto, verifica-se que o biótipo São Paulo apresentou

aproximadamente 90% de redução da MPAS com apenas 163 g ha⁻¹ de e.a., tornando evidente sua maior sensibilidade ao herbicida (Fig. 3.2 B).

Em relação aos valores de GR₅₀ ajustados pelo SigmaPlot, verifica-se que os biótipos 277, 283 e 300 necessitaram as maiores doses para obter 50% de controle, de 264,52; 246,59 e 256,78 g ha⁻¹ de e.a., respectivamente. No entanto, os biótipos São Paulo, Papanduva, 287 apresentaram GR₅₀ inferiores a 100 g ha⁻¹ de e.a.

Os biótipos São Paulo e 287 foram os mais sensíveis ao herbicida, apresentando os menores valores de GR₅₀ e GR₈₀. Os biótipos 277, 300, Papanduva e 283 necessitaram doses maiores que 800 g ha⁻¹ de e.a., para reduzir em 80% MPAS (GR₈₀), superiores a usualmente utilizada em lavouras comerciais. Compete destacar que o biótipo Papanduva, apesar de apresentar um GR₅₀ baixo (99 g ha⁻¹ de e.a), necessita de 954 g ha⁻¹ de e.a. para se ter 80% de redução da MPAS, ou seja, é necessário um incremento de 900% da dose para um aumento de 60% na redução da MPAS.

Tabela 3.4 - Parâmetros das equações ajustadas, GR₅₀, GR₈₀ e Fator de tolerância (FT) para MPAS dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	Parâmetros ¹				GR ₈₀ **	FT
	A	B	X0(GR ₅₀)*	R ²		
277	106,28	1,22	264,52	0,91	876	3,7
283	102,58	0,99	246,59	0,93	1033	3,4
300	109,78	1,30	256,78	0,94	815	3,6
São Paulo ²	102,04	3,03	72,21	0,99	115	1
Papanduva	101,34	0,62	99,26	0,91	954	1,4
287	100,22	1,14	73,62	0,99	249	1,0

¹Equação logística de três parâmetros. ²Biótipo considerado sensível. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, GR₅₀= Dose que proporciona 50% de redução da MPAS, GR₈₀= Dose que proporciona 80% de redução da MPAS. *Valores ajustados pelo programa Sigmaplot. **Índice estimado por meio da planilha eletrônica Excel®.

Os fatores de tolerância (FT) variaram entre 1,0 (biótipos São Paulo e Papanduva) e próximo a 4,0, para os biótipos 277, 283 e 300 (Tab.3.3), indicando que esses biótipos necessitaram de quatro vezes a dose do biótipo sensível (São Paulo) para atingir 50% de controle das plantas. Nenhum biótipo apresentou FT menor que 1, ou seja, o biótipo que foi considerado sensível, adquirido de empresa que comercializa sementes de espécies daninhas, foi efetivamente o mais sensível

ao herbicida glyphosate, dentre os estudados.

Tabela 3.5 – Significância e coeficientes de correlação entre as variáveis controle visual (100 - controle) e MPAS dos biótipos de *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum (a) e para os biótipos de *Richardia brasiliensis* (b) aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.

Biótipos	<i>Borreria latifolia</i> (a)	Biótipos	<i>Richardia brasiliensis</i> (b)
	Controle X MPAS		Controle X MPAS
277	0,88*	271	0,86*
283	0,88*	283	0,92**
300	0,92**	285	0,49 ^{ns}
São Paulo	0,94**	São Paulo	0,71 ^{ns}
Papanduva	0,97**	Papanduva	0,65 ^{ns}
287	0,87*	277	0,86*
Geral	0,91**	Geral	0,75**

* e **: significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro.

As correlações entre o controle visual e MPAS para os biótipos de *B. latifolia* na avaliação aos 28 DAA foram elevadas e significativas (Tab. 3.5). Os valores dos coeficientes de correlação para controle x MPAS apresentaram significância a 1 e 5%, variando entre 0,87 e 0,97, sendo observado um coeficiente de correlação geral de 0,91.

3.3.2 Resposta de biótipos de *R. brasiliensis*

O biótipo 271 foi controlado eficientemente (85%) com apenas 360 g ha⁻¹ de e.a., sendo que, para a mesma dose, o controle das plantas do biótipo 283 foi de apenas 10%. É importante destacar que os biótipos 271 e São Paulo foram coletados em áreas sem histórico de aplicação de glyphosate, e portanto a maior tolerância nos demais biótipos provavelmente está associada à pressão de seleção exercida pelo herbicida.

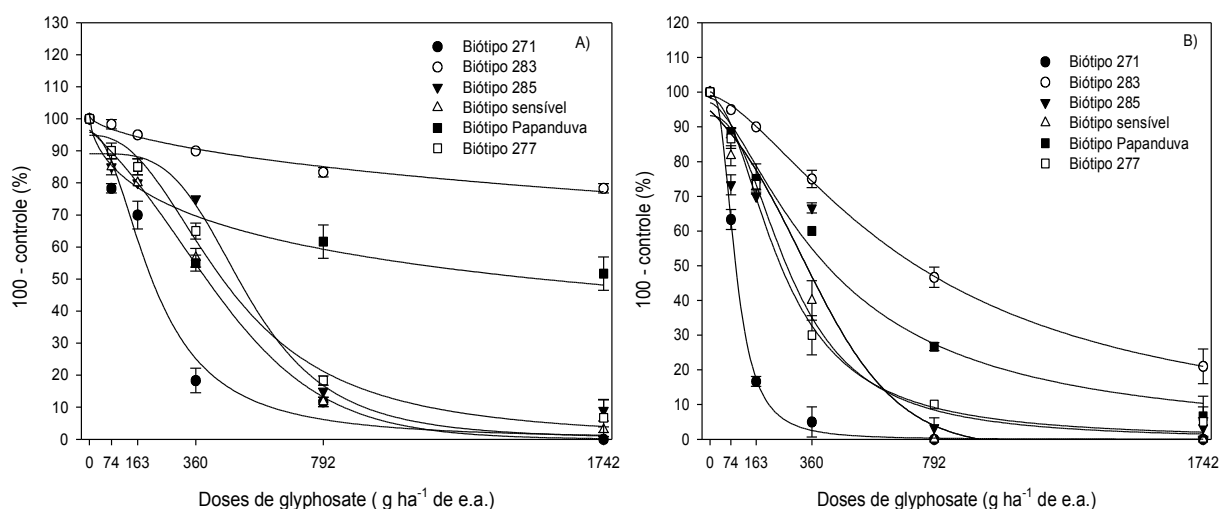


Figura 3.3 - Controle (100 – controle) de biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.

Aos 28 DAA, houve incremento significativo nos níveis de controle e redução das diferenças entre biótipos (Fig. 3.3 B). Os biótipos Papanduva e 283 apresentaram menores níveis de controle com 792 g ha⁻¹ de e.a., totalizando 73 e 53%, respectivamente. Com o emprego da maior dose (1742 g ha⁻¹ de e.a.), ocorreu 100% de controle para o biótipo sensível, porém, não houve morte das plantas dos biótipos 277, 285, Papanduva e 283, totalizando 95, 97, 93 e 79% de controle, respectivamente. O biótipo 271 (sensível) apresentou 95% de controle com a dose de 360 g ha⁻¹ de e.a.. A dose de 792 g ha⁻¹ de e.a. (dose superior à usada em muitas propriedades, de 720 g ha⁻¹ de e.a.), provocou grande diferenciação entre os biótipos, promovendo apenas 53% de controle do biótipo mais tolerante e 100% do biótipo sensível.

A literatura mostra uma grande variabilidade de resultados de controle de *R. brasiliensis* com glyphosate, pois enquanto muitos trabalhos sinalizam a dificuldade de controle desta planta daninha com este herbicida, alguns indicam níveis de controle satisfatórios. A maior tolerância apresentada pelo biótipo 283 de *R. brasiliensis* no presente estudo é semelhante à demonstrada em outros estudos com a mesma espécie. O uso isolado de glyphosate na dose 770 g ha⁻¹ de i.a, para o controle de *R. brasiliensis* apresentou baixa eficiência, tendo atingido no máximo 14% de controle (SHARMA; SINGH, 2001). Resultados semelhantes foram observados por Cechin et al. (2012), que relataram controle de 17% aos 21 DAA,

com 2880 g ha⁻¹ de e.a. de glyphosate.

No entanto, controle de 99,5% dessa planta daninha aos 28 DAA com 720 g i.a ha⁻¹ de glyphosate, superior aos demais herbicidas alternativos testados, foi constatado por Vitorino et al. (2012). Ao pesquisarem a espécie *Richardia scabra*, com mesmo gênero do que *R. brasiliensis*, Reddy e Singh (1992) obtiveram níveis de controle superiores a 94%, com 500 e 1000 g ha⁻¹ de i.a. de glyphosate.

Os resultados contrastantes podem estar relacionados a diferenças entre biótipos e também quanto ao estágio de desenvolvimento da planta no momento da aplicação. A aplicação de glyphosate isolado na dose de 420 g ha⁻¹ de e.a. resultou em controle de plantas de *R. brasiliensis* em estágio inicial de desenvolvimento de 60% aos 7 DAA e de 90% aos 14 DAA, porém a dose de 2160 g ha⁻¹ de e.a. de glyphosate não controlou de maneira eficiente esta planta daninha em fase adulta (MONQUERO et al., 2005).

Os valores de C₅₀ ajustados pelo SigmaPlot aos 14 DAA, para os biótipos Papanduva e 283 foram superiores a 1000 g ha⁻¹ de e.a. (Tab. 3.6). Entretanto, o C₅₀ do biótipo sensível foi de apenas 219,7 g ha⁻¹ de e.a.

Tabela 3.6 - Parâmetros das equações ajustadas, C₅₀ e C₈₀ para o controle dos biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 14 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	Parâmetros ¹				C ₈₀ **
	A	B	X0(C ₅₀)*	R ²	
271 ²	95,80	2,09	219,70	0,97	415
283	100,82	0,63	1403,93	0,97	>1742
285	89,13	3,78	538,29	0,96	747
São Paulo	92,51	2,42	406,48	0,98	692
Papanduva	101,67	0,56	1443,28	0,86	>1742
277	94,88	2,39	470,86	0,99	818

¹Equação logística de três parâmetros. ²Biótipo considerado sensível. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, C₅₀= Dose que proporciona 50% de controle, C₈₀= Dose que proporciona 80% de controle. *Valores ajustados pelo programa Sigmaplot. **Índice estimado por meio da planilha eletrônica Excel®.

Em relação ao C₈₀, os mesmos biótipos destacaram-se, apresentando um valor de C₈₀ superior à maior dose testada no presente estudo (Tab. 3.6). Incluem-se no grupo dos mais tolerantes (C₈₀ acima de 1000), os biótipos 283 e Papanduva. O biótipo sensível apresentou C₈₀ de 415 g ha⁻¹ de e.a..

Na avaliação efetuada aos 28 DAA, os níveis de controle dos biótipos

foram incrementados, o que resultou em valores de C_{50} ajustados pelo SigmaPlot menores que na avaliação aos 14 DAA. Os biótipos 283, 285 e Papanduva apresentaram os maiores valores de C_{50} , totalizando 735,56; 468,71 e 429,80 g ha⁻¹ de e.a., respectivamente, enquanto o biótipo sensível apresentou C_{50} de 90,56 g ha⁻¹ de e.a. (Tab. 3.7). Valores acima de 400 g ha⁻¹ de e.a. foram necessários para os biótipos Papanduva e 285 atingirem 50% de controle.

Tabela 3.7 - Parâmetros das equações ajustadas, C_{50} , C_{80} e Fator de tolerância (FT) para o controle dos biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	Parâmetros ¹				C_{80} **	FT
	A	B	X0(C_{50})*	R ²		
271 ²	100,07	2,64	90,56	0,99	153	1,00
283	98,86	1,57	735,56	0,99	>1742	8,12
285	81,29	5,62	468,71	0,93	572	5,18
São Paulo	93,21	2,29	288,88	0,98	533	3,18
Papanduva	96,94	1,52	429,80	0,98	1043	4,75
277	98,21	2,00	254,57	0,99	503	2,81

¹Equação logística de três parâmetros. ²Biótipo considerado sensível. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, C_{50} = Dose que proporciona 50% de controle, C_{80} = Dose que proporciona 80% de controle. *Valores ajustados pelo programa Sigmaplot. **Índice estimado por meio da planilha eletrônica Excel®.

O biótipo sensível apresentou C_{50} de 90 g ha⁻¹ de e.a.. O biótipo 283 apresentou C_{80} superior a maior dose utilizada no experimento (1742 g ha⁻¹ de e.a.) enquanto que o biótipo 271, considerado sensível, necessitou de apenas 153 g ha⁻¹ de e.a. para provocar o mesmo efeito.

Houve redução expressiva da MPAS com o incremento das doses de glyphosate (Fig. 3.4), reforçando os dados apresentados para o controle visual, e também foi possível demonstrar elevada variabilidade de resposta ao glyphosate entre os biótipos de *R. brasiliensis* avaliados. O biótipo 283 apresentou menor redução de MPAS com o emprego de 792 g ha⁻¹ de e.a. totalizando 73%, respectivamente, enquanto o biótipo 271 (sensível) apresentou 92% de redução. Quando foi empregada a maior dose (1742 g ha⁻¹ de e.a.) o biótipo 283 apresentou a menor redução na MPAS, de 76%, enquanto o biótipo sensível apresentou redução de 90%.

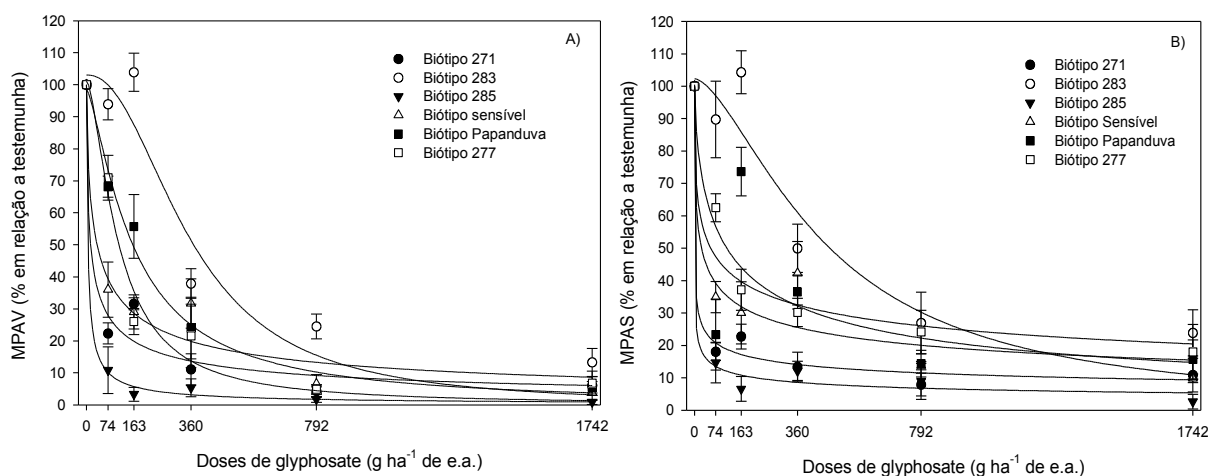


Figura 3.4 - Redução da massa da parte aérea verde (A) e massa da parte aérea seca (B) de biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento.

Os valores de GR_{50} estimados pelo Sigma Plot variaram entre 0,23 (biótipo 285) e 459,77 g ha⁻¹ de e.a. (biótipo 283) (Tab. 3.8). Os valores estimados pelo Excel para GR_{80} variaram entre 17 e >1742 g ha⁻¹ de e.a. (Tab. 3.8).

Tabela 3.8 - Parâmetros das equações ajustadas, GR_{50} , GR_{80} e Fator de tolerância (FT) para MPAS dos biótipos de *Richardia brasiliensis* Gomes aos 28 DAA em resposta à doses de glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	Parâmetros ¹					
	A	B	X0(GR_{50})*	R ²	GR_{80} **	FT
271 ²	99,99	0,29	0,79	0,99	87	1
283	102,31	1,59	459,77	0,89	1116	581,99
285	99,99	0,32	0,23	0,99	17	0,29
São Paulo	99,84	0,39	24,73	0,93	794	31,30
Papanduva	99,39	0,39	58,44	0,70	>1742	73,97
277	100,46	0,64	111,04	0,98	979	140,56

Equação logística de três parâmetros. ²Biótipo considerado sensível. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, GR_{50} = Dose que proporciona 50% de redução da MPAS, GR_{80} = Dose que proporciona 80% de redução da MPAS. *Valores ajustados pelo programa Sigmaplot. **Índice estimado por meio da planilha eletrônica Excel®.

O biótipo Papanduva apresentou um GR_{80} superior a maior dose utilizada, ou seja, a mesma não foi capaz reduzir 80% da MPAS do biótipo. Para efeito de comparação, o biótipo 271, considerado sensível apresentou GR_{80} de apenas 87 g ha⁻¹ de e.a. (Tab. 3.8).

Na espécie *R. brasiliensis*, os coeficientes de correlação entre o

controle visual e MPAS para os biótipos na avaliação aos 28 DAA foram menores e apenas três foram significativas (Tab. 3.5), variaram entre 0,49 e 0,92. A correlação geral, considerando todos os biótipos, foi de 0,75.

Os resultados supracitados evidenciam elevada variabilidade de resposta ao glyphosate entre biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. Essa variabilidade pode ser atribuída ao processo de seleção com glyphosate a que as populações de plantas daninhas são submetidas. A intensificação de uso do glyphosate nas lavouras de soja no Sul do Brasil aumentou com a ampla e rápida adoção pelos agricultores de culturas geneticamente modificadas (CGM), com resistência ao glyphosate, a partir do final da década de 90. A seleção de plantas daninhas com resistência e/ou tolerância a herbicida é considerada o processo de maior risco na adoção de CGM no Brasil e América do Sul (CERDEIRA et al., 2010).

Desde a introdução de cultivares geneticamente modificadas resistentes ao glyphosate, na cultura da soja, têm ocorrido a seleção de espécies mais tolerantes a este herbicida, como a trapoeraba (*Commelina* spp.), cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.), poaia-branca (*R. brasiliensis*), erva-quente (*B. latifolia*), entre outras. Esse fenômeno tem ocorrido em outros locais do mundo, em espécies tais como *Ambrosia artemisiifolia* e *Sesbania exaltata*, entre outras. No Brasil, há também grande evolução da área infestada com biótipos resistentes ao glyphosate, principalmente em espécies de *Conyza*, em *Digitaria insularis* e *Lolium multiflorum* (CORREIA et al., 2010; LAMEGO et al., 2013; GALVAN et al., 2011).

As plantas daninhas são organismos biológicos evoluindo em resposta às mudanças ambientais (distúrbio e estresse), que determinam mudanças na composição das espécies em uma determinada área (RADOSEVICH et al., 2007). A utilização repetitiva de um mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação e espectro de controle de plantas daninhas por diversos anos também provoca mudanças da flora infestante, pois há intensificação do processo de seleção de plantas daninhas resistentes e tolerantes ao agente selecionador (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; MONQUERO, 2003).

As diferenças de respostas existentes entre distintos trabalhos avaliando a resposta das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* na literatura podem ser atribuídas a vários fatores. Primeiramente, a variabilidade genética inerente aos

biótipos. Em segundo lugar, as condições de desenvolvimento das plantas antes e após a aplicação do herbicida, como a radiação solar, temperatura, disponibilidade hídrica, umidade relativa do ar. Em terceiro lugar, o estágio fisiológico das plantas daninhas no momento da aplicação, pois plantas mais jovens apresentam barreiras menores para a ação dos herbicidas (CHAUHAN; ABUGHO, 2012). Dias et al. (2013) verificaram que plantas de trapoeraba tornam-se quatro vezes mais tolerantes ao glyphosate a cada dez unidades de desenvolvimento fenológico na escala Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry (BBCH) adaptada de Hess et al. (1997), ou seja, medidas de controle químico em estádios iniciais do crescimento da trapoeraba, reduzem a dose de glyphosate e, conseqüentemente, seu custo de aplicação, com diminuição na pressão de seleção sobre biótipos tolerantes a esse herbicida e redução dos danos ao agroecossistema.

A aplicação de herbicidas com no máximo 3 pares de folhas resultou em nível de controle de 87,5% com 1080 g i.a. ha⁻¹ na espécie *Borreria densiflora*, mesmo gênero de *B. latifolia*, sendo que observações preliminares de aplicações pós-emergentes evidenciaram que a planta daninha se torna tolerante quando apresenta a fenologia de 4-5 pares de folhas, levando então, ao insucesso no controle pelos herbicidas (MARTINS, 2014). Isso provavelmente pode ser extrapolado para outros trabalhos que avaliam a resposta a doses de glyphosate para esta espécie. Takano et al. (2013) observaram que o glyphosate isolado apresentou 99,5% de controle para plantas aplicadas com estágio fenológico acima de 10 folhas na espécie *B. latifolia*, já a espécie *R. brasiliensis* apresentou apenas 82,5% de controle para as mesmas condições supracitadas.

Existem pelo menos seis mecanismos gerais que podem explicar a tolerância de plantas daninhas a herbicidas: absorção e translocação reduzidas, maior metabolização do herbicida para substâncias com menor atividade fitotóxica, compartimentalização da molécula herbicida, falta de afinidade do herbicida com o local de ação específico e super-expressão da enzima alvo (GALON et al., 2009; MONQUERO et al., 2004; SANDBERG et al., 1980).

Em estudo desenvolvido por Galon et al. (2013), evidenciou-se que a espécie *B. latifolia* apresentou menor translocação do glyphosate, sendo que aproximadamente 89% do produto aspergido permaneceu na folha 72 horas após a

aplicação, e apenas 2% do herbicida atingiu as raízes, ou seja, a espécie *B. latifolia* apresentou menor translocação do glyphosate comparado com *B. pilosa* (espécie considerada sensível ao glyphosate), e isso poderia ser um dos mecanismos que proporcionam maior tolerância a este herbicida, interferindo assim na eficiência do mesmo. Já, em *Ipomoea nil*, os mesmos autores observaram que ocorreu translocação eficiente do glyphosate e que o mecanismo de tolerância poderia estar associado à metabolização ou exsudação do produto, devido à grande quantidade de herbicida que atingiu as raízes da espécie (GALON et al., 2013).

Os mecanismos de tolerância de *C. benghalensis* ao glyphosate são a absorção e o metabolismo diferencial do herbicida ao se transformarem em AMPA (ácido aminometilfosfônico, principal metabólito do glyphosate em algumas plantas naturalmente tolerantes a este herbicida) (MONQUERO et al., 2004) e em *I. grandifolia*, a tolerância ocorre devido à baixa translocação do herbicida (MONQUERO et al., 2004; PAZUCH, 2013).

No presente estudo, foram empregados diversos biótipos para as duas espécies estudadas, que foram pulverizados no mesmo estágio de desenvolvimento (seis à oito folhas totalmente expandidas) em condições similares de ambiente. Fica, portanto, evidente que as diferenças de controle estão relacionadas à variabilidade genética inerente às diferentes populações.

Com a aplicação dos questionários sobre o manejo das áreas, aos proprietários que tiveram biótipos analisados, foi possível obter algumas justificativas que podem ter contribuído para a tolerância diferencial ao herbicida glyphosate.

Dos questionários respondidos (Tabela 3.9), 67% relataram alto grau de dificuldade para controlar plantas daninhas da família Rubiaceae e 22% relataram médio grau de dificuldade para obter controle das mesmas, ou seja, 89% das áreas analisadas apresentavam infestações com espécies Rubiaceae como um dos principais problemas de controle (Tab. 3.9).

Tabela 3.9 - Características dos pontos de coletas dos biótipos tolerantes e sensíveis ao glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

<i>B. latifolia</i>				
Biótipo	Dificuldade para controle	Doses de glyphosate utilizadas	Tempo de cultivo de cultivares RR	Fator de tolerância*
277	Alta	4,0 – 4,5 l ha ⁻¹	8 anos	4,1
283	Alta	4,0 – 4,5 l ha ⁻¹	9 anos	4,1
300	Alta	3,5 – 4,0 l ha ⁻¹	7 anos	3,9
São Paulo	—	—	—	—
Papanduva	Média	2,5 l ha ⁻¹ /sequencial	2 anos	1,1
287	Média	2,5 – 3,0 l ha ⁻¹	3 anos	2,7
<i>R. brasiliensis</i>				
271	—	—	—	—
283	Alta	4,0 – 4,5 l ha ⁻¹	9 anos	8,12
285	Alta	4,0 l ha ⁻¹	8 anos	5,18
São Paulo	—	—	—	—
Papanduva	Alta	3,5 – 4,0 l ha ⁻¹ /sequencial	6 ano	4,75
277	Baixa	2,0 l ha ⁻¹	3 anos	2,81

* FT = GR₅₀ biótipo/GR₅₀ biótipo S

Outro ponto relevante observado, foram as doses de glyphosate empregadas para o manejo das áreas, que variaram entre 720 à 1620 g ha⁻¹ de e.a., muitas vezes sem obter controle satisfatório das espécies rubiáceas presentes (Tab. 3.9). Nas áreas com maior grau de dificuldade de controle das espécies da família Rubiaceae, os agricultores estavam utilizando doses acima de 1080 g ha⁻¹ de e.a., acima da recomendada para aplicações em dessecação na região. Evidenciou-se também que as áreas onde foram realizadas as coletas apresentavam distintos períodos desde o início da adoção da tecnologia RR nas lavouras de soja, e que o período desde o início de adoção foi diretamente proporcional às doses utilizadas e à dificuldade de controle das espécies rubiáceas com glyphosate (Tab. 3.9), ou seja, as maiores dificuldades de controle foram relatadas em áreas que a tecnologia RR tinha sido adotada há mais de seis anos.

Com os resultados do presente estudo, foi possível comprovar que o biótipo 271 de *R. brasiliensis*, coletado em área sem histórico de aplicação do glyphosate, foi o mais sensível entre os estudados, contribuindo para a afirmação de que sistemas de cultivo e manejo de plantas daninhas nas lavouras tem influência na seleção de biótipos mais tolerantes.

O aumento do nível de tolerância de uma população de plantas

daninhas promove sobrevivência dos indivíduos mais tolerantes e leva à mortalidade dos mais sensíveis, o que aumenta a frequência de genes de tolerância na população sobrevivente, levando ao incremento gradativo no valor de C_{50} , similarmente ao que ocorre com as populações em que o caráter resistência a herbicidas é dominado por múltiplos genes (NEVE et al., 2003). Dessa forma, acredita-se que as populações com maiores valores de C_{50} , detectadas no presente experimento, estejam situadas em um grau mais avançado do processo evolução da tolerância ao glyphosate.

Nos últimos tempos, a incidência de espécies daninhas tolerantes e de populações resistentes no Brasil assumiram proporções bastantes grandes, sendo que níveis de tolerância a herbicidas preocupantes já foram atingidos por várias espécies daninhas, de Norte a Sul do país (GALON et al., 2013). Diante disso, verifica-se a necessidade de investigação dos mecanismos responsáveis ou causas prováveis da seleção dessas espécies. Muitos trabalhos na literatura estudaram os mecanismos de resistência ao glyphosate em populações de espécies daninhas, entretanto, pouco enfoque é dado para os mecanismos de tolerância a esse herbicida em espécies daninhas. É de suma importância a investigação de diferenças entre biótipos de espécies tolerantes, coletados em situações de pressão de seleção distintos, permitindo assim identificar modificações em populações após o aumento da pressão de seleção imposta pelos herbicidas.

A existência de populações com alta tolerância indica a necessidade de execução de ações conjuntas, seja por parte dos agricultores, pelo uso consciente dos herbicidas, ou pelas empresas, disponibilizando uma diversidade maior de herbicidas com mecanismos de ação diferenciados, bem como o interesse da comunidade acadêmica e dos órgãos de pesquisas em aprofundar os conhecimentos sobre biologia e os mecanismos fisiológicos que conferem este caráter às plantas daninhas presentes nos sistemas de cultivo.

3.4 CONCLUSÕES

Houve variabilidade de resposta ao herbicida glyphosate entre os biótipos das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* coletados em diferentes locais do

Paraná e Santa Catarina.

Alguns biótipos de ambas as espécies estudadas não foram controlados com doses de glyphosate acima das usualmente utilizadas nas lavouras, evidenciando seleção pelo uso repetitivo do herbicida glyphosate.

Os resultados encontrados apontam uma relação positiva entre a dificuldade de controle de alguns biótipos de ambas as espécies estudadas com o período de utilização de glyphosate nas áreas agrícolas.

4 ABSORÇÃO FOLIAR E TRANSLOCAÇÃO DE GLYPHOSATE RADIOMARCADO EM BIÓTIPOS DE *B. latifolia* e *R. brasiliensis* COM RESPOSTA CONTRASTANTES AO GLYPHOSATE

RESUMO

Em lavouras de soja da região Sul do país, espécies daninhas pertencentes à família Rubiaceae se destacam quanto à tolerância ao herbicida glyphosate. Diversos mecanismos podem conferir tolerância aos herbicidas em plantas daninhas, dentre os quais a redução na absorção e/ou translocação. Esse estudo objetivou elucidar se a absorção foliar e a translocação constituem mecanismos importantes de tolerância ao glyphosate em biótipos de *B. latifolia* e *Richardia brasiliensis*. Biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foram cultivados e selecionados na UTFPR, Campus Pato Branco e o estudo de absorção/translocação foi desenvolvido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, na Universidade de São Paulo. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado com três repetições para os dois estudos, em esquema fatorial 2 x 5, em que o primeiro fator foram os biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* (sensível e com maior tolerância) e o segundo fator os períodos após a aplicação (2, 8, 24, 48 e 72 horas (HAA)). A solução herbicida foi composta por uma mistura de ^{14}C -glyphosate + padrão analítico (360 g ha⁻¹ e.a. de glyphosate em 200 L ha⁻¹). A absorção do herbicida foi determinada pela porcentagem da radioatividade no interior da planta (folhas tratadas, folhas acima, folhas abaixo das tratadas, caule e raiz) em relação a radioatividade total recuperada (líquido de lavagem + radioatividade no interior da planta). A translocação foi determinada pela combustão das partes em oxidador biológico, com posterior quantificação da radioatividade por cintilação líquida. Para ambas as espécies estudadas (*B. latifolia* e *R. brasiliensis*), os biótipos sensíveis absorveram mais ^{14}C -glyphosate (média de 87 e 75%) que o tolerante (média de 78 e 70%), respectivamente. A maior parte do herbicida absorvido ficou depositada na folha tratada, com diferenças de translocação entre os biótipos apenas nas avaliações efetuadas 48 e 72 HAA para *R. brasiliensis* e 72 HAA para *B. latifolia*. Nestes períodos, as translocações para *R. brasiliensis* e *B. latifolia* (biótipos sensível e tolerante) foram de 19% e 11% e 6 e 3%, respectivamente. É possível que diferenças de translocação entre os biótipos constituam um dos mecanismos de tolerância de biótipos de espécies rubiáceas ao glyphosate.

Palavras-chave: Mecanismo de tolerância. Tolerância. Rubiaceae. Erva-quente. Poaia-branca.

ABSTRACT

In soybean growing areas of southern Brazil, the weeds belonging to the Rubiaceae family are highlighted by their tolerance to glyphosate. Several mechanisms may cause weed herbicide tolerance, among them, are the decrease in the absorption

and/or translocation. The objective of this study was to elucidate whether foliar absorption and translocation explain glyphosate tolerance mechanisms in *B. latifolia* and *R. brasiliensis* biotypes. *B. latifolia* and *R. brasiliensis* biotypes were grown and selected at the UTFPR, Pato Branco Campus and the absorption/translocation bioassays were developed at the Center for Nuclear Energy in Agriculture - CENA, at the University of São Paulo. A completely randomized design with three replications was used in a 2 x 5 factorial scheme, in which the first factor was the *B. latifolia* and *R. brasiliensis* (sensitive and with greater tolerance) biotypes and the second factor was the time elapsed after the application (2, 8, 24, 48 and 72 hours (HAA)). The herbicide solution was composed of a mixture of ^{14}C -glyphosate + analytical standard (200 L ha⁻¹ of 360 g glyphosate a.e.). The herbicide uptake was determined by the plant radioactivity percentage (treated leaves, top leaf layer, lower leaf layer, stem, and root) in relation to the total radioactivity recovered (washing liquid + radioactivity inside the plant). The translocation was evaluated by combustion in the biological oxidizer, with subsequent quantification of the radioactivity by liquid scintillation. For both species studied (*B. latifolia* and *R. brasiliensis*), sensitive biotypes absorbed more ^{14}C -glyphosate than tolerant. Most of the absorbed herbicide was deposited on the treated leaf, with translocation differences between the biotypes only in the evaluated evaluations 48 and 72 HAA for *R. brasiliensis* and 72 HAA for *B. latifolia*. It is possible that translocation differences between the biotypes constitute one of the mechanisms of tolerance of biotypes of rubiaceous species to glyphosate.

Keywords: Mechanism of tolerance. Tolerance. Rubiaceae. Broadleaf buttonweed. White-eye.

4.1 INTRODUÇÃO

Entre os métodos de controle de plantas daninhas, os herbicidas tem sido os mais utilizados, devido à maior praticidade e grande eficiência (FERREIRA et al., 2009). O controle químico apresenta inúmeras vantagens, entretanto, pode acarretar em muitos malefícios quando utilizado de maneira equivocada, tais como o controle ineficiente das espécies daninhas, ocorrência de danos e perdas produtivas em culturas comerciais causadas por fitotoxicidade e também problemas ambientais (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Além disso, a utilização sequencial de um mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação e espectro de controle de plantas daninhas por diversos anos pode selecionar populações de plantas daninhas resistentes e também tolerantes a herbicidas.

Com a liberação do cultivo da soja Roundup Ready® resistente ao herbicida glyphosate (soja RR®) em meados de 2005, o manejo de plantas daninhas

sofreu alterações e o uso de glyphosate aumentou, pois passou a ser utilizado em pós-emergência da cultura (PEREIRA et al., 2008). Atualmente, a maioria dos agricultores realiza três aplicações do produto por ciclo da soja (NOHATTO, 2010). Essa prática, aliada a outras práticas de manejo inadequadas nas lavouras, desencadeou uma intensificação da seleção de plantas daninhas em sistemas de cultivo agrícolas. A seleção intraespecífica de plantas daninhas resulta em biótipos resistentes, e a seleção interespecífica resulta em mudança da flora para espécies mais tolerantes.

A tolerância de plantas daninhas aos herbicidas está disseminada do Norte ao Sul do Brasil (GALON et al., 2013). Em lavouras de soja da região Sul do país, espécies pertencentes às famílias Convolvulaceae, Rubiaceae e Commelinaceae são as que apresentam maior importância dentre as tolerantes ao herbicida glyphosate. Há fortes indícios que a dose necessária para controlar determinadas populações tolerantes esteja se deslocando para um patamar superior, resultado de processo de seleção em que indivíduos que toleram doses mais elevadas sobrevivem e indivíduos mais suscetíveis são eliminados.

Desde a introdução de cultivares geneticamente modificadas resistentes ao glyphosate na cultura da soja, têm ocorrido a seleção de espécies com maior tolerância ao herbicida glyphosate, como a trapoeraba (*Commelina* spp.), cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.), poaia-branca (*Richardia brasiliensis*), erva-quente (*Borreria latifolia*), entre outras. Esse fenômeno tem ocorrido em outros locais do mundo, em espécies tais como *Ambrosia artemisiifolia*, *Sesbania exaltata*, entre outras.

Nas áreas infestadas com espécies tolerantes é frequente a utilização de doses de herbicidas acima da recomendada (GALON et al., 2013), gerando impacto negativo às espécies cultivadas e forte impacto ambiental e à saúde humana e indicando que o processo de seleção referido acima está em curso. O incremento de doses de herbicidas para controlar populações tolerantes, que tem sido observado em lavouras de diversas regiões do Brasil reflete, provavelmente, o acúmulo de genes que conferem maior tolerância em biótipos.

Existem diversos mecanismos que podem conferir tolerância à plantas daninhas aos herbicidas, podendo influenciar negativamente a ação destes

compostos, destacando-se a menor absorção e/ou translocação do herbicida, maior metabolização do herbicida a substâncias menos fitotóxicas, compartimentalização das moléculas dos herbicidas, falta de afinidade do herbicida pelo sítio de ação específico, além de super produção da enzima-alvo (SILVA et al., 2007; GALON et al., 2009). Esses mecanismos agem de forma diferenciada de acordo com a espécie daninha. Por exemplo, em estudo determinando a absorção foliar, translocação e a metabolização do ^{14}C -glyphosate em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*, Monquero et al. (2004) constataram que o mecanismo de tolerância de *C. benghalensis* ao glyphosate são a absorção diferencial e a metabolização do herbicida pela planta, em *I. grandifolia* a tolerância ocorre devido a uma menor translocação do herbicida, não havendo evidências de metabolização diferencial do herbicida por esta planta daninha.

O herbicida glyphosate é aplicado em pós-emergência e, para alcançar sua eficiência, é necessário que ocorra a retenção da molécula na superfície foliar, penetração foliar, translocação na planta até o sítio de ação e a inibição da enzima-alvo enolpiruvilshiquimato-P-sintetase (EPSPs) (KIRKWOOD; MCKAY, 1994).

Há vários exemplos na literatura demonstrando que a tolerância de plantas daninhas ao glyphosate se deve à absorção ou translocação diferencial do herbicida (WYRILL; BURNSIDE, 1976; SANDBERG et al., 1980; WESTWOOD et al., 1997; SATICHIVI et al., 2000; CHACHALIS et al., 2001).

Para garantir a eficiência de um determinado herbicida no controle de plantas daninhas é de suma importância que ocorra a penetração do mesmo nos tecidos vegetais (PROCÓPIO et al., 2003). Herbicidas aplicados em pós-emergência, como o glyphosate, penetram nas plantas através de estruturas aéreas, como folhas, caule, frutos e flores (SILVA et al., 2007), sendo a absorção foliar o passo mais importante para que ocorra interação do herbicida com os processos metabólicos da planta (PROCÓPIO et al., 2003).

Possíveis alterações na absorção de herbicidas podem estar relacionadas com as características morfo-anatômicas das espécies daninhas, englobando a parte aérea e o sistema radicular, dependendo da via preferencial de absorção. A espessura da cutícula das folhas e a sua composição química, podem dificultar a penetração na planta de certos herbicidas, enquanto facilita a penetração

de outros dependendo do Kow (coeficiente de partição octanol/água) e da característica de ionização do herbicida (SILVA et al., 2007).

A membrana cuticular é composta por uma camada de ceras epicuticulares, ceras embebidas, cutinas, pectinas e celulose. As ceras epicuticulares podem atuar como principal barreira à penetração de produtos químicos (LIAKOPOULOS; STAVRIANOKOU; KARABOURNIOTIS, 2001). As ceras epicuticulares e cuticulares contém longas cadeias de alcanos, porém em pequenas porcentagens e outras substâncias como alcoóis, aldeídos, ácidos graxos e cetonas (HESS; CHESTER, 2000). A composição química das ceras epicuticulares é variável entre os distintos grupos filogenéticos, podendo apresentar diferenças na composição dentro dos mesmos grupos, espécies, ou entre os estádios de desenvolvimento de um mesmo indivíduo e também por condições ambientais (MONQUERO et al., 2005).

As ceras epicuticulares apresentam suma importância na absorção dos herbicidas, devido a isso, vários trabalhos relatam que a quantidade e composição das ceras epicuticulares podem ser a principal barreira de absorção e subsequente translocação de herbicidas aplicados na folhagem de plantas daninhas (HATTERMAN-VALENTI et al., 2006).

Em estudo anatômico realizado com as espécies *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica* Procópio et al., (2003) observaram que *C. incana* apresentou como principal obstáculo foliar potencial à penetração de herbicidas o alto teor de cera epicuticular, já em *I. cairica* a grande espessura da cutícula e baixa densidade estomática na face adaxial, além do alto teor de cera epicuticular foram os prováveis obstáculos constatados a penetração de herbicidas.

Em estudo realizado para avaliar a absorção e translocação de glyphosate em *Ipomoea lacunosa*, *Echinochloa crus-galli* e *Sida spinosa*, Norsworthy et al. (2001) verificaram que apenas 6% do glyphosate aplicado nas folhas de *Ipomoea lacunosa* foi absorvido 48 horas após o tratamento (HAT), enquanto que em *Echinochloa crus-galli* e *Sida spinosa* absorveram 33 e 22% respectivamente, sugerindo que a tolerância ao glyphosate seja devido a absorção limitada desse herbicida.

Após a absorção, os herbicidas necessitam atingir os locais de ação para exercer sua atividade. O caminho a ser percorrido pode ser pequeno para herbicidas de contato, ou longo para herbicidas sistêmicos que são translocados pelo apoplasto e simplasto (VIDAL, 2002). A translocação representa um processo essencial para a eficácia do herbicida (WANAMARTA; PENNER, 1989).

O glyphosate apresenta mobilidade no floema, seguindo a rota dos assimilados oriundos das folhas fotossinteticamente ativas (fonte) em direção às partes das plantas em crescimento (dreno), para manutenção do metabolismo e/ou formação de produto de reserva, das raízes, dos tubérculos, das folhas jovens e de zonas meristemáticas (HETHERINGTON et al., 1998). Portanto, a absorção, translocação e metabolização do herbicida podem afetar a sensibilidade de uma planta, pois este necessita atingir o sítio de ação numa concentração adequada para apresentar eficiência.

Em espécies daninhas, a translocação reduzida é uma causa importante para o controle insatisfatório. A translocação reduzida traz como consequência a inabilidade do herbicida em alcançar o local de ação, após ter penetrado na planta. Geralmente existem diferenças marcantes de translocação entre herbicidas e, para um mesmo produto, há diferenças entre espécies de plantas (AGOSTINETTO; VARGAS, 2009).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi elucidar se a absorção e a translocação constituem mecanismos importantes de tolerância ao glyphosate em biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram realizados nas dependências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, no Campus Luiz de Queiroz – Piracicaba da Universidade de São Paulo, um para cada espécie da família Rubiaceae (*Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis*).

As plantas foram cultivadas em vasos, casa de vegetação nas dependências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, quando atingiram estágio de aplicação de 4 a 6 folhas totalmente expandidas, foram transportadas

para a Universidade de São Paulo. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia – CENA/USP.

Os estudos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, organizado em esquema fatorial (períodos x biótipos), em que cada planta representa uma unidade experimental. Os períodos de avaliação foram 2, 8, 24, 48, 72 horas após aplicação (HAA) com o herbicida, totalizando 15 plantas por biótipo oriundas da mesma planta mãe, no total de 30 plantas para os dois biótipos de cada espécie daninha estudada. Em cada experimento foram analisados um biótipo considerado tolerante e outro considerado sensível ao glyphosate, de acordo com valores de C_{50} estimados anteriormente, através da investigação de resposta a doses de glyphosate em 14 biótipos de *B. latifolia* e 11 biótipos de *R. brasiliensis* coletados em lavouras de soja transgênica ou em locais sem pressão de seleção por glyphosate. As localizações das áreas onde foram coletadas as sementes dos biótipos, tempo de adoção da cultura da soja RR juntamente com os FT encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Identificação e características dos locais em que foram coletadas as sementes dos biótipos tolerantes e suscetível ao glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

<i>B. latifolia</i>				
Biótipo	Dificuldade para controle	Doses de glyphosate utilizadas	Tempo de cultivo de cultivares RR	Fator de tolerância*
277	Alta	4,0 – 4,5 l ha ⁻¹	8 anos	4,1
São Paulo	–	–	–	–
<i>R. brasiliensis</i>				
283	Alta	4,0 – 4,5 l ha ⁻¹	9 anos	8,12
São Paulo	–	–	–	–

* FT = GR₅₀ biótipo/GR₅₀ biótipo S

As sementes de *B. latifolia* sofreram tratamento de superação de dormência antes da semeadura, com calor seco a 60°C por 30 minutos e imersão em nitrato de potássio (2%) por 3 horas. Logo em seguida, as sementes de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foram alocadas em gerbox e colocadas em condições ideais para germinação em BOD à 25°C com fotoperíodo de 12/12 horas.

Conforme foram germinando, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 500 ml, contendo solo peneirado e deixados em casa de

vegetação com condições controladas. Quando as plantas atingiram entre 4 e 6 folhas totalmente expandidas, procedeu-se a aplicação do glyphosate marcado com carbono 14 no radical fosfometil, apresentando atividade específica de 537,4 MBq mmol⁻¹ e 96,81% de pureza. A solução herbicida foi composta por uma mistura de ¹⁴C- glyphosate + padrão analítico, na concentração de 360 g ha⁻¹ e.a. de glyphosate com volume de calda de 200 l ha⁻¹. Essa solução foi aplicada na face adaxial do último par de folhas totalmente expandidas, sob a forma de dez gotas de 1,0 µl por folha, totalizando 20 gotas por planta com auxílio de um microaplicador (Hamilton PB6000 Dispenser, Hamilton Co. EUA).

Após o término de cada período de leitura, procedeu-se o corte das folhas tratadas para parar o processo de translocação para o restante da planta. As folhas tratadas foram colocadas dentro de um funil disposto sobre frasco de cintilação e lavadas com 1 ml (lavadas 3 vezes com o auxílio de uma pipeta calibrada para 1000 µl) de uma solução de metanol 80%, a fim de quantificar o herbicida não absorvido. Do líquido proveniente dessa lavagem, foi retirada uma alíquota de 500 µl e misturada com 10 ml de líquido de cintilação, para posteriormente realizar a análise da radioatividade dessa mistura, através de espectrometria de cintilação líquida (ECL) (Packard 1900 TR). Após cada período de avaliação, as plantas foram lavadas para remoção de todo o solo de suas raízes, e secas a 40°C até atingir massa constante. Posteriormente foram submetidas a combustão em oxidador biológico (OX 600 Harvey Instruments) para posterior quantificação da radioatividade através de ECL e determinado a translocação em cada parte da planta.

Através dessa metodologia empregada foi possível determinar a absorção do herbicida através da porcentagem da radioatividade presente no interior da planta (folhas tratadas, folhas acima, folhas abaixo das tratadas, caule e raiz) em relação a radioatividade total recuperada (líquido de lavagem + radioatividade no interior da planta). Para análise dos dados de absorção, total translocado e distribuição de glyphosate radiomarcado (¹⁴C-glyphosate) em cada parte da planta foram calculadas as médias das três repetições, juntamente com os respectivos desvios-padrões.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 *Richardia brasiliensis*

Os parâmetros das equações ajustadas para as variáveis absorção e total translocado de glyphosate radiomarcado em biótipos de *R. brasiliensis* estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros das equações e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis absorção e total translocado em resposta a períodos de avaliação de glyphosate radiomarcado em biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* com respostas contrastantes ao glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Variável	Espécie	Biótipo	Parâmetro equação				R^2
			a	b	x0	y0	
Absorção	<i>R. brasiliensis</i>	283 ²	65,77	2,86	14,62	29,86	0,99
		São Paulo ²	61,49	2,65	14,02	36,94	0,99
	<i>B. latifolia</i>	277 ¹	87,33	3,82	0,79	-	0,89
		São Paulo ¹	96,71	2,61	1,20	-	0,99
Total translocado	<i>R. brasiliensis</i>	283 ²	10,32	3,13	16,26	0,62	0,95
		São Paulo ²	18,57	7,27	19,90	1,34	0,98
	<i>B. latifolia</i>	277 ¹	20,59	3,32	80,90	-	0,97
		São Paulo ¹	55,68	115,50	31,64	-	0,82

¹Equação logística de três parâmetros. ²Equação logística de quatro parâmetros. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, x0 ou C₅₀= Período (horas) que proporciona 50% de absorção, y0=média da resposta sob período elevado.

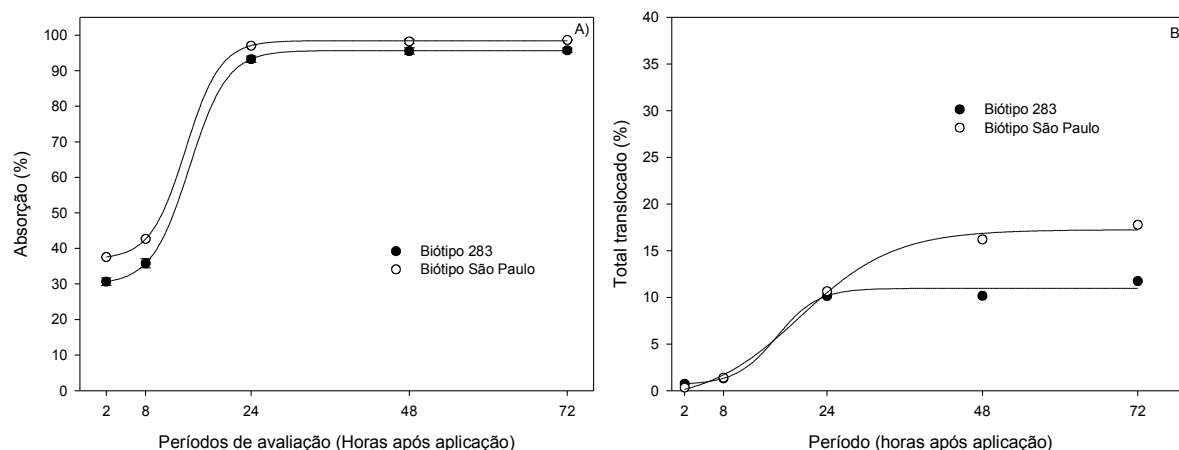


Figura 4.1 – Absorção (A) e total translocado (B) para biótipos de *R. brasiliensis* em resposta a aplicação de glyphosate radiomarcado. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O biótipo sensível absorveu um pouco mais ¹⁴C-glyphosate (média de 75%) que o tolerante (média de 70%) (Fig. 4.1 A). Houve maior translocação do herbicida no biótipo sensível a partir de 48 HAA, totalizando 18% no período de 72

HAA, comparativamente a 12% de translocação do herbicida no biótipo tolerante (Fig. 4.1 B). A maior parte do herbicida absorvido ficou depositada na folha tratada (Fig. 4.2 A, B, C, D e E), com diferenças de translocação entre os biótipos apenas nas avaliações efetuadas 48 e 72 HAA (Fig. 4.2 D e E).

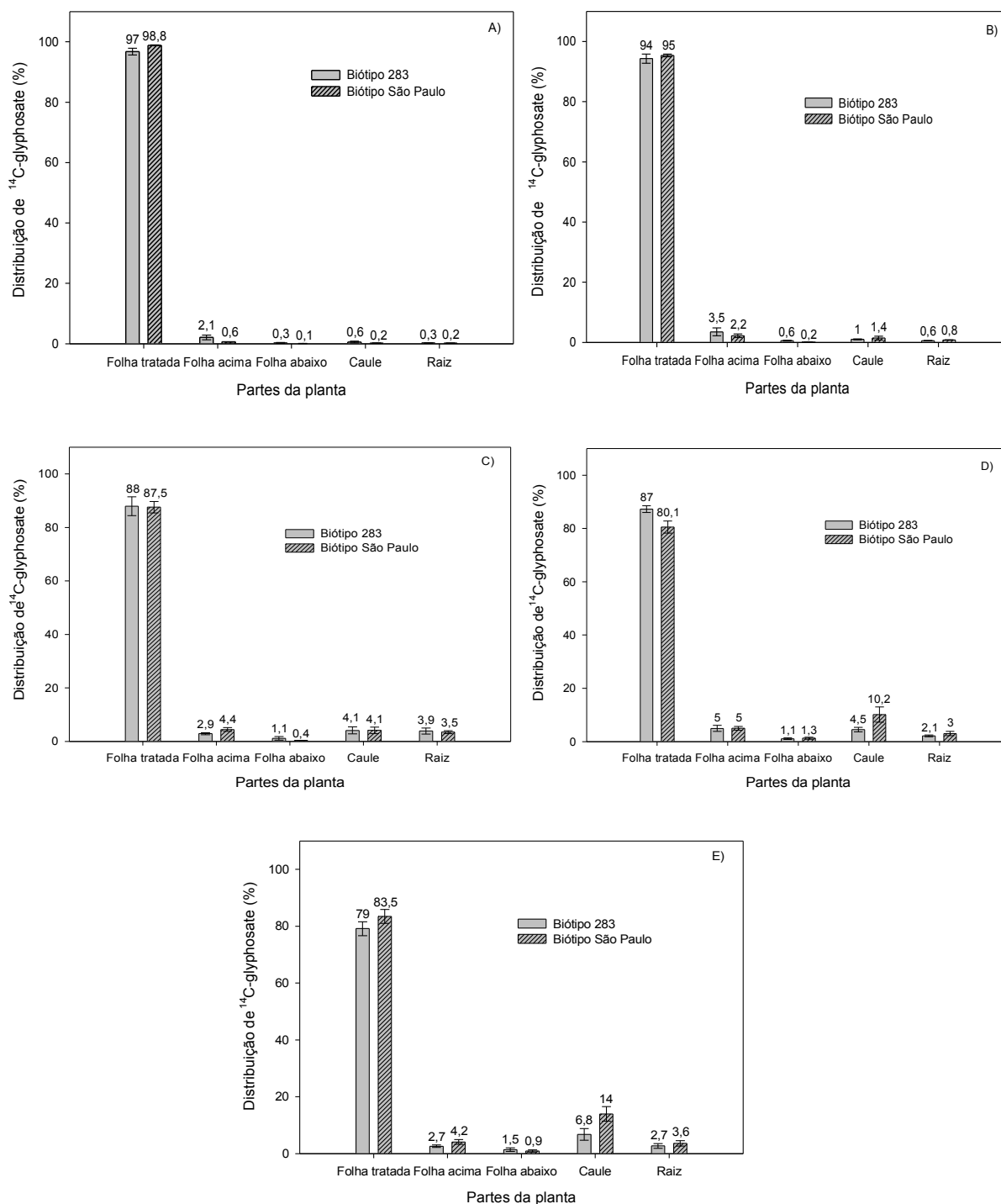


Figura 4.2 – Distribuição de glyphosate radiomarcado em biótipos de *R. brasiliensis* no período de 2 (A), 8 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 (E) horas após a aplicação (HAA). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Nestes períodos, a translocação do herbicida para o caule do biótipo sensível, superou a translocação ao caule das plantas tolerantes em 6,8 e 14%, nas avaliações efetuadas a 48 e 72 HAA, respectivamente.

4.3.2 *Borreria latifolia*

Os parâmetros das equações ajustadas para as variáveis absorção e translocação total de glyphosate radiomarcado em biótipos de *B. latifolia* estão apresentados na tabela 4.2. Houve menor absorção no biótipo 277 (com maior tolerância) a partir de 2 HAA, entretanto, no período de 72 HAA não evidenciou-se diferença significativa na absorção entre os dois biótipos com respostas contrastantes ao glyphosate (Fig. 4.3 A).

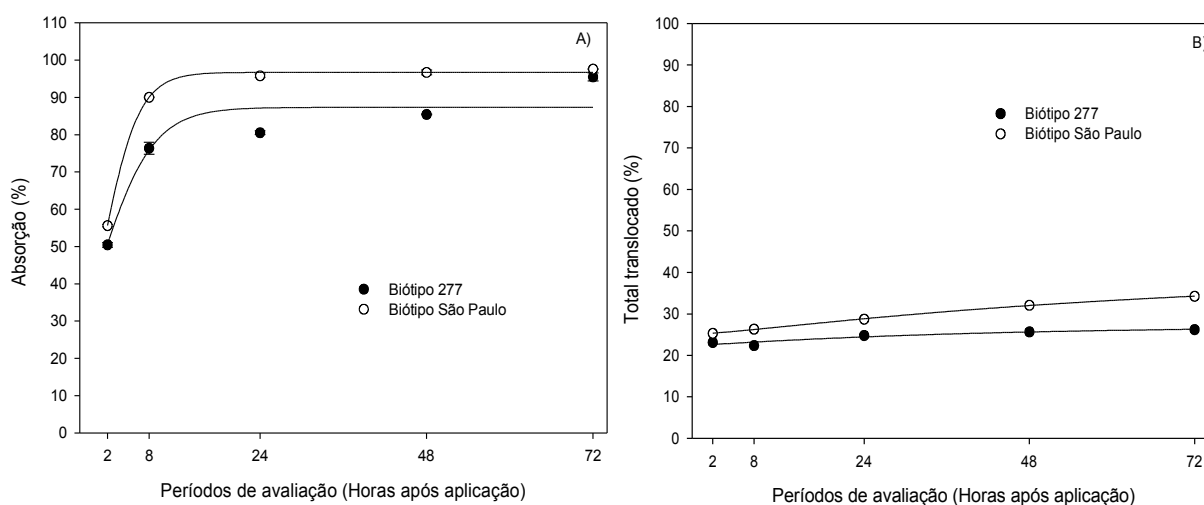


Figura 4.3 – Total absorvido (A) e total translocado (B) para biótipos de *B. latifolia* em resposta a aplicação de glyphosate radiomarcado. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A translocação foi maior no biótipo mais sensível, atingindo 34%, enquanto no biótipo com maior tolerância houve translocação de 26% do glyphosate radiomarcado (Fig. 4.3 A).

Evidenciou-se que grande parte do herbicida radiomarcado aplicado não translocou pelas partes da planta, concentrando-se na folha aplicada (Fig. 4.4 A, B, C, D e E).

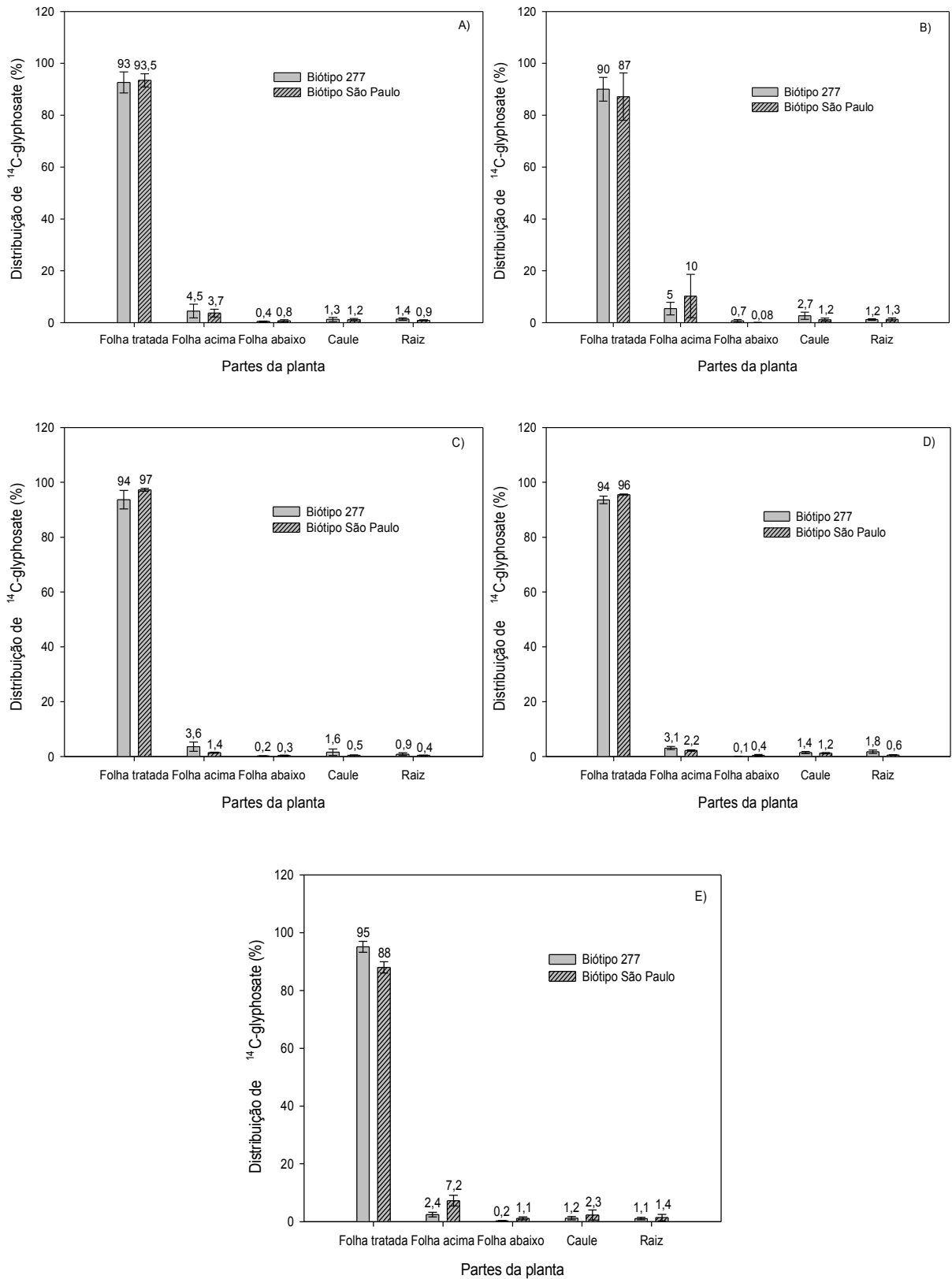


Figura 4.4 – Distribuição de glyphosate radiomarcado em biótipos de *B. latifolia* no período de 2 (A), 8 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 (E) horas após a aplicação (HAA). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Houve diferença significativa na translocação pelas partes da planta apenas no último período de avaliação (72 HAA) (Fig. 4.4 E), verificando-se maior translocação para a folha acima da tratada no biótipo mais sensível, em relação ao mais tolerante, atingindo 7,2 e 2,4%, respectivamente.

As diferenças na suscetibilidade de espécies de plantas daninhas a herbicidas tem sido atribuídas ao estágio de desenvolvimento da planta, à diferença na morfologia (área e forma do limbo, ângulos ou orientação das folhas em relação ao jato de pulverização), à anatomia foliar (presença de estômatos e tricomas, espessura e composição da camada cuticular e às diferenças na absorção, translocação, compartimentalização, alteração no local de ação, super-expressão da enzima alvo e no metabolismo da molécula herbicida (WESTWOOD et al., 1997; VARGAS et al., 1999; TUFFI SANTOS et al., 2004; POWLES & YU, 2010).

Através da análise dos dados é possível inferir que a tolerância ao glyphosate em biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* está associada a barreiras no momento da translocação, pois a maior parte do herbicida radiomarcado aplicado permaneceu na folha tratada de ambas as espécies. A translocação é um processo essencial para garantir a eficiência de um herbicida sistêmico (WANAMARTA; PENNER, 1989), principalmente de glyphosate (DELLACIOPPA et al., 1986). Os resultados corroboram com estudo desenvolvido por Galon et al. (2013), que observaram em quatro espécies daninhas avaliadas (*Ipomoea nil*, *Tridax procumbens*, *Spermacoce latifolia* e *Bidens pilosa*) no período de 72 HAA, o glyphosate permaneceu em uma proporção maior na folha de aplicação. No entanto, uma maior taxa de translocação do herbicida foi detectada em *B. pilosa* e *I. nil* em comparação com *S. latifolia* e *T. procumbens*. Em *Ipomoea grandifolia*, Monquero et al., (2004) verificaram absorção de 80% (72 HAT), no entanto 68,5% do herbicida aplicado permaneceu na folha tratada, e apenas 2,2; 4,3 e 4,9% foram translocados para a parte aérea, caule e raiz, respectivamente. Recentemente, Brunharo et al. (2015) identificaram biótipos de *Chloris elata* com absorção reduzida e maior retenção foliar de glyphosate.

A variabilidade de tolerância entre biótipos pode ser determinada por vários fatores, os mesmos responsáveis pela determinação da resistência em populações de plantas daninhas. Nos modelos de previsão de resistência, a

evolução é determinada por frequência inicial do alelo de resistência, dominância e tipo de polinização da espécie, tamanho da área tratada com o herbicida e o grau de infestação da área e também o mecanismo de ação do herbicida e sua frequência de uso na área problema (VIDAL; FLECK, 1997).

Há indícios de que o principal fator atuando no processo seletivo seja a frequência de utilização do herbicida glyphosate nas áreas. Os biótipos com maior tolerância, empregados no presente estudo, são oriundos de áreas com uso intensivo do herbicida glyphosate (Tabela 4.1), já os dois biótipos com maior sensibilidade de ambas as espécies, foram adquiridos da Empresa Agrocósmos provêm de áreas sem histórico de uso do glyphosate. Diante disso, evidencia-se a presença de seleção direcional positiva na presença de glyphosate e seleção direcional negativa na ausência de glyphosate.

No entanto, deve ser levado em conta que o glyphosate é o herbicida mais utilizado com a principal característica de largo espectro de controle empregado tanto no plantio direto quanto no manejo de plantas daninhas em culturas tolerantes ao glyphosate. Como resultado desse uso excessivo e contínuo, houve expansão das infestações com espécies tolerantes rapidamente em culturas onde esse herbicida é empregado como principal ferramenta de controle (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ-OVEJERO, 2003; VARGAS et al., 2007). Glyphosate aplicado isoladamente não controla algumas espécies de plantas daninhas tolerantes, havendo a necessidade de associações com outros ingredientes ativos com mecanismo de ação diferente. Misturas em tanque de glyphosate com chlorimuron-ethyl, cloransulam-methyl, lactofen e imazethapyr favoreceram o controle das plantas daninhas tolerantes ao glyphosate, a trapoeraba (*C. benghalensis*) e a erva-de-touro (*T. procumbens*) (MACIEL et al., 2011). O uso de glyphosate em misturas com herbicidas aplicados em soja convencional aumenta o espectro e a eficácia de controle de plantas consideradas mais tolerantes à ação do glyphosate isolado (PROCÓPIO et al., 2007). Monquero et al. (2001) constataram controle de *C. benghalensis* superior a 80%, quando utilizada a mistura de glyphosate com herbicidas bentazon, chlorimuron-ethyl, flumioxazin e sulfentrazone.

No presente estudo, as diferenças de absorção e translocação não são expressivas, evidenciando-se que possa estar ocorrendo outro mecanismo de

tolerância, e dessa forma, acarretando em maior tolerância dessas espécies rubiáceas ao herbicida glyphosate. Uma planta com capacidade de degradar rapidamente um herbicida pode potencialmente inativá-lo antes que ele possa chegar ao local de ação na planta e dessa forma vir a causar danos irreversíveis provocando a morte da planta (BURHLER, 2013). A velocidade de metabolização pode variar com a espécie, estágio de desenvolvimento da planta e com a temperatura a que está exposta, ou seja, depende do ambiente, evidenciando que uma mesma quantidade de herbicida aplicada em uma espécie pode tornar-se fitotóxica sob determinadas condições para algumas plantas e não produzir nenhum dano em outras (KISSMANN, 2003).

Mais pesquisas precisam ser feitas para verificar se estes efeitos realmente ocorrem devido uma metabolização da molécula de glyphosate em substância menos fitotóxica. Consultando estudos já desenvolvidos sobre metabolismo de glyphosate, alguns mostram que essa metabolização não acontece (Mallik et al., 1989), por outro lado, muitos mostram que o metabolismo do glyphosate pode acontecer (Monquero et al, 2004; Ferreira et al, 2006). Uma planta com a capacidade de degradar rapidamente um herbicida pode potencialmente inativá-lo antes que ele possa chegar ao seu local de ação na planta (BURHLER, 2016).

Nos solos e nas plantas, o principal metabólito do glyphosate é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (BONFLEUR et al., 2011), detectado em algumas plantas naturalmente tolerantes a este herbicida, como *Agropyron repens* e *Equisetum arvense* (COUPLAND, 1985; DYER, 1994). No presente estudo para as espécies tolerantes ao glyphosate *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, o glyphosate pode ter sido degradado em substância não-fitotóxica pela via do ácido aminometilfosfônico e dessa forma impedindo a ação da molécula de glyphosate que iria causar a morte das plantas.

As ceras epicuticulares podem atuar como principal barreira à penetração de produtos químicos (LIAKOPOULOS; STAVRIANOKOU; KARABOURNIOTIS, 2001), a quantidade e composição das ceras epicuticulares podem ser a principal barreira de absorção e subsequente translocação de herbicidas aplicados na folhagem de plantas daninhas (HATTERMAN-VALENTI et

al., 2006). No estudo de ceras (próximo capítulo) da presente tese, evidenciou-se que a produção de ceras epicuticulares foi incrementada pelo déficit hídrico, com maior ênfase nos biótipos mais tolerantes ao glyphosate tanto para a espécie *Richardia brasiliensis* quanto para *Borreria latifolia*, podendo justificar o menor controle do biótipo tolerante 283 e 277, respectivamente, ao herbicida glyphosate quando submetidos as condições hídricas CC e PMP.

O entendimento dos mecanismos é fundamental para que alternativas de manejo sejam planejadas melhorando assim a eficácia do produto, preservando os herbicidas e garantindo um controle eficiente e econômico para a agricultura. Com esse conhecimento, possíveis alternativas podem ser procuradas a fim de controlar essas plantas daninhas tolerantes ao glyphosate.

4.4 CONCLUSÕES

Para ambas as espécies estudadas (*B. latifolia* e *R. brasiliensis*), os biótipos sensíveis absorveram mais ¹⁴C-glyphosate que o tolerante.

A maior parte do herbicida absorvido ficou depositada na folha tratada, com diferenças de translocação entre os biótipos apenas nas avaliações efetuadas 48 e 72 HAA para *R. brasiliensis* e 72 HAA para *B. latifolia*.

É possível que diferenças de translocação entre os biótipos constituam um dos mecanismos de tolerância de biótipos de espécies rubiáceas ao glyphosate.

5 EFEITO DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NO SOLO SOBRE A QUANTIDADE DE CERAS EPICUTICULARES E RESPOSTA AO GLYPHOSATE EM ESPÉCIES E BIÓTIPOS DE RUBIÁCEAS

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram quantificar as ceras epicuticulares das folhas e determinar a ação de glyphosate em biótipos sensíveis e tolerantes de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, sob dois regimes hídricos. Dois experimentos foram conduzidos em vasos, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foram utilizados um biótipo sensível, um com tolerância intermediária e um com elevada tolerância ao glyphosate das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, selecionados em ensaio preliminar. No primeiro experimento, plantas com quatro folhas de cada biótipo foram submetidas aos regimes hídricos de 80% da capacidade de campo (denominado CC) e 30% da capacidade de campo (denominado ponto de folhas verdadeiras, em duas plantas por repetição mensurou-se a área foliar e procedeu-se a extração das ceras epicuticulares com solução de clorofórmio+metanol (90+10 mL), calculando-se a quantidade de cera por unidade de área foliar ($\mu\text{g cm}^2$). O segundo experimento investigou a resposta dos mesmos biótipos a cinco doses de glyphosate (0, 72, 163, 360 e 792 g ha⁻¹ de e.a.), sob CC e PMP. A aplicação do glyphosate ocorreu no estágio de seis folhas expandidas e avaliou-se o controle aos 14 e 28 DAA, massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) aos 28 DAA e determinou-se a dose necessária para reduzir 50% massa seca da parte aérea (GR₅₀). A produção de ceras epicuticulares foi incrementada pelo déficit hídrico. Os biótipos 283 (*R. brasiliensis*) e 277 e 300 (*B. latifolia*), com maior tolerância ao glyphosate, tiveram maior incremento na deposição de ceras epicuticulares na condição de déficit hídrico. Os valores de GR₅₀ foram aumentados na condição de PMP, em relação a CC, em maior magnitude nos biótipos tolerantes de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* do que nos sensíveis. Para a espécie *B. latifolia*, houve correlação positiva entre a quantidade de cera epicuticular e o GR₅₀ (tolerância ao glyphosate), tanto sob boa disponibilidade quanto sob déficit hídrico. Para a espécie *R. brasiliensis*, correlação positiva entre essas variáveis somente ocorreu em PMP.

Palavras-chave: *B. latifolia*. *R. brasiliensis*. Estresse hídrico. Capacidade de campo. Ponto de murcha permanente.

ABSTRACT

The objectives of the present work were to quantify the leaf epicuticular waxes and to determine the action of glyphosate in sensitive and tolerant biotypes of *B. latifolia* and *R. brasiliensis* under two water regimes. Two bioassays were conducted in pots using a completely randomized design and four replications. A sensitive biotype, one with intermediate tolerance and one with high glyphosate tolerance of *B. latifolia* and

R. brasiliensis were used after being selected in a preliminary test. In the first experiment, plants with four leaves of each biotype were submitted to water regimes of 80% (field capacity - CC) and 30% of the field capacity (permanent wilt point - PMP). The number of true leaves, the leaf area index and the epicuticular waxes extracted with chloroform + methanol solution (90 + 10 mL) and determined per unit leaf area ($\mu\text{g cm}^{-2}$) were measured in two plants per replication. The second bioassay investigated the biotypes response to five glyphosate concentrations (0, 72, 163, 360 and 792 g ha^{-1} of a.e.) in CC and PMP treatments. The glyphosate was applied in the six expanded leaf stage and the control was evaluated at 14 and 28 DAA, green air part mass (MPAV) and dry aerial mass (MPAS) and evaluating also the dose required to reduce 50% shoots dry matter (GR_{50}). The epicuticular waxes production was increased by the water restriction. The *R. brasiliensis* biotypes 283 and 277 and *B. latifolia* 300, with higher tolerance to glyphosate, had a major increase in the deposition of epicuticular waxes under water restriction. The GR_{50} values were increased in the PMP condition in relation to CC, in a higher magnitude for the tolerant biotypes of *B. latifolia* and *R. brasiliensis* in comparison with the sensitive ones. For *B. latifolia*, there was a positive correlation between the amount of epicuticular wax and the GR_{50} (tolerance to glyphosate), independent of the water availability factor. For *R. brasiliensis*, a positive correlation between these variables only occurred in PMP.

Keywords: *B. latifolia*. *R. brasiliensis*. Hydrical stress. Field capacity. Permanent wilting point.

5.1 INTRODUÇÃO

Para aumentar a eficiência de um determinado herbicida no controle de plantas daninhas é de suma importância que ocorra a penetração do mesmo nos tecidos vegetais (PROCÓPIO et al., 2003). Herbicidas aplicados em pós-emergência, como o glyphosate, penetram nas plantas através de estruturas aéreas, como folhas, caule, frutos e flores (SILVA et al., 2007).

Possíveis alterações na absorção de herbicidas podem estar relacionadas com as características morfo-anatômicas das espécies daninhas, englobando a parte aérea e o sistema radicular, dependendo da via preferencial de absorção. A espessura da cutícula das folhas e a sua composição química bem como características físico-químicas dos herbicidas podem influenciar a penetração de certos herbicidas na planta. Dentre as características físico-químicas dos herbicidas importantes para a absorção estão o K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água) e o pka (constante de ionização) e a polaridade (SILVA et al., 2007;

VIDAL, 2002). O conhecimento nas características de polaridade (polar ou apolar) dos herbicidas é de suma importância para ter conhecimento da rota de absorção dos mesmos. Herbicidas apolares são absorvidos pela rota lipofílica, enquanto os polares pela rota hidrofílica. A hidratação das plantas, além de favorecer a rota hidrofílica atua também na rota lipofílica pois, quando a parede celular, composta por pectina e celulose, é hidratada, ocorre o afastamento das placas de ceras, permitindo assim maior permeabilidade e conseqüentemente maior absorção do herbicida (SILVA et al., 2000).

Como consequência da evolução química e biológica, os organismos vivos têm desenvolvido uma série de estruturas de natureza polimérica, que os isolam e os protegem do meio externo. Nas plantas superiores, essa função é assumida pela cutícula vegetal ou membrana cuticular (HEREDIA et al., 1998). A membrana cuticular é composta por uma camada de ceras epicuticulares, ceras embebidas, cutinas, pectinas e celulose. As ceras epicuticulares podem atuar como principal barreira à penetração de produtos químicos (LIAKOPOULOS et al., 2001). As ceras epicuticulares e cuticulares contêm longas cadeias de alcanos, porém em pequenas porcentagens e outras substâncias como álcoois, aldeídos, ácidos graxos e cetonas (HESS; CHESTER, 2000).

A espessura e composição química das ceras epicuticulares é variável entre os distintos grupos filogenéticos, podendo apresentar diferenças na composição dentro dos mesmos grupos, espécies, ou entre os estádios de desenvolvimento de um mesmo indivíduo e também segundo as condições ambientais (MONQUERO et al., 2005).

As ceras epicuticulares apresentam suma importância na absorção dos herbicidas e por isso a quantidade e composição das ceras epicuticulares podem ser a principal barreira de absorção e subsequente translocação de herbicidas aplicados na folhagem de plantas daninhas (HATTERMAN-VALENTI et al., 2006). Em estudo anatômico realizado com as espécies *G. parviflora*, *C. incana*, *C. bonariensis* e *I. cairica*, Procópio et al., (2003) observaram que em *C. incana* o elevado teor de cera epicuticular foi o principal obstáculo foliar potencial à penetração de herbicidas enquanto em *I. cairica* a grande espessura da cutícula e baixa densidade estomática na face adaxial, além do elevado teor de cera epicuticular foram os prováveis

obstáculos constatados à penetração de herbicidas.

Em estudo realizado para avaliar a absorção e translocação de glyphosate em *Ipomoea lacunosa*, *Echinochloa crus-galli* e *Sida spinosa*, Norsworthy et al. (2001) verificaram que apenas 6% do glyphosate aplicado nas folhas de *Ipomoea lacunosa* foi absorvido 48 horas após o tratamento (HAT), enquanto *Echinochloa crus-galli* e *Sida spinosa* absorveram 33 e 22%, respectivamente, sugerindo que a tolerância ao glyphosate seja devido a absorção limitada desse herbicida.

Em um levantamento das causas de tolerância ou resistência ao glyphosate em muitas espécies daninhas, foi constatado que as espécies *Ambrosia artemisiifolia*, *Echinochloa colona*, *Chenopodium album*, *Ipomoea lacunosa*, *Xanthium strumarium*, *Camelina microcarpa*, *Setaria viridis*, *Hordeum vulgare*, *Avena fatua*, *E. crus-galli* e *Convolvulus arvensis* apresentaram baixa absorção de glyphosate. Dessas espécies com baixa absorção do herbicida, *I. lacunosa* e *C. album* absorveram 10 vezes mais glyphosate do que *C. arvensis*. Mesmo assim, apresentaram muito pouco acúmulo de chiquimato-3-P (indicativo de fitotoxicidade) e não apresentaram sequestro de glyphosate para o vacúolo, indicando que outro mecanismo está envolvido na tolerância ao glyphosate (SAMMONS; GAINES, 2014). Outro mecanismo que tem chamado muito a atenção é à rápida necrose e à incapacidade de glyphosate ser exportado para o restante da planta, a partir de folhas mais velhas, identificado em *Ambrosia trifida* resistente ao glyphosate (ROBERTSON, 2010).

Os objetivos deste trabalho foram quantificar as ceras epicuticulares e determinar a ação de glyphosate em biótipos sensíveis e tolerantes de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, sob dois regimes hídricos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, em vasos plásticos com volume de 4400 cm³, alocados em casa-de-vegetação, nas dependências da UTFPR, Campus Pato Branco (26°07'S e 52°41'W). Os vasos foram preenchidos com solo proveniente da

Área Experimental do Curso de Agronomia, classificado como Latossolo Vermelho distroférico com textura muito argilosa. O solo foi peneirado para retirada de partículas grosseiras. As sementes de todos os biótipos utilizados foram colhidas a partir de um conjunto de plantas reunidas em bulk.

O primeiro experimento foi arranjado em um esquema fatorial 2 x 3, em que o primeiro fator foram as duas condições hídricas do solo (CC e PMP) e o segundo fator os biótipos das espécies que apresentaram respostas contrastantes ao herbicida glyphosate, em experimento preliminar conduzido em condição de telado nas dependências da UTFPR, Campus Pato Branco. Utilizaram-se seis biótipos, três de *B. latifolia* e três de *R. brasiliensis*. Os biótipos de *R. brasiliensis* São Paulo, Papanduva e 283 foram classificados como sensível, moderadamente tolerante e tolerante, respectivamente. Para a espécie *B. latifolia* foram considerados sensível, moderadamente tolerante e tolerante, os biótipos São Paulo, 300 e 277, respectivamente. Foram utilizadas três plantas por vaso de cada biótipo selecionado.

Cada biótipo foi submetido a dois regimes hídricos contrastantes, o primeiro próximo a capacidade de campo do solo (CC) e o segundo próximo ao ponto de murcha permanente (PMP). Determinou-se o PMP e CC em mesa de tensão, conforme Klein (1998), no Laboratório de Física do Solo da UTFPR, Campus Pato Branco, sob a condição desestruturada de solo. Foram coletadas amostras de solo indeformadas, em anéis volumétricos de 60mm de altura e 60mm de diâmetro, diretamente de vasos empregados em estudo preliminar, obtendo-se a curva de retenção de água específica, bem como as respectivas umidades para cada regime hídrico (CC a 47% e PMP a 26% de umidade). Foi mantida a umidade correspondente a 80% da CC para alta disponibilidade hídrica e cerca de 30% da CC para o PMP.

As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, até alcançarem o estágio fenológico de quatro folhas totalmente expandidas, a partir do qual foram submetidas à condição hídrica específica (CC ou PMP), controlada por meio da pesagem diária dos vasos com solo, com reposição do volume de água necessário para alcançar a condição ideal.

Após alcançar o estágio de 6 folhas verdadeiras (ao final de 12 dias no interior da casa-de-vegetação), sob condição hídrica específica, procedeu-se a

extração das ceras epicuticulares de duas folhas do terço médio de cada planta em duas plantas por repetição. Foi mensurada a área foliar, conforme metodologia utilizada por Monquero (2005), com algumas adaptações, com o integrador de área foliar LICOR 3100 e, em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada para retirar possíveis impurezas, mergulhadas em uma solução extratora de clorofórmio+metanol (90+10 mL) em beckers de vidro, sendo agitados cuidadosamente por 30s, para evitar ruptura das folhas e extravasamento de clorofila e outros compostos. Após, a solução foi colocada em capela de exaustão até completa evaporação e então o sólido (cera) foi quantificado através de pesagem. Calculou-se o quociente entre a quantidade de cera e a área foliar de cada amostra, expressando-a em $\mu\text{g cm}^2$. A cera foi ressuspensa e transferida para vials de 1,5 mL para posterior análise da composição química (dados não amostrados na presente tese).

O segundo estudo foi conduzido em fatorial $2 \times 3 \times 5$, sendo o primeiro fator as condições hídricas do solo (CC e PMP), o segundo fator três biótipos com respostas contrastantes ao glyphosate como supracitado e o terceiro fator cinco doses do herbicida glyphosate 0, 72, 163, 360 e 792 g e.a. ha^{-1} .

Para o desenvolvimento das plantas, empregou-se a mesma metodologia utilizada no primeiro experimento. A aplicação do herbicida glyphosate ocorreu após as plantas alcançarem o estágio vegetativo de seis a oito folhas totalmente expandidas (14 dias após os vasos serem alocados no fitotron). A aplicação foi realizada com pulverizador costal pressurizado com CO_2 .

Foram avaliados os níveis de controle das plantas de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* aos 14 e 28 DAA e massa da parte aérea verde e seca das plantas aos 28 DAA. Os níveis de controle foram avaliados por meio de avaliações visuais utilizando a metodologia proposta por Frans et al. (1986), em que 0% significa ausência de controle e 100% significa destruição total da planta (morte).

Os dados obtidos, em ambos os experimentos, foram submetidos a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade de erro experimental, com auxílio do programa estatístico WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005). As médias de variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e a relação entre níveis de fator quantitativo foram ajustadas por regressão não linear

(Equação logística de três parâmetros). Os gráficos foram confeccionados com o auxílio do programa computacional Sigmaplot 10.0.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Quantificação de ceras epicuticulares em biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* sob dois regimes hídricos distintos

No estudo para quantificar as ceras epicuticulares em biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* houve significância ($p < 0,05$) para a interação entre os fatores condições hídricas x biótipos para ambas as espécies. As quantidades de ceras variaram entre 62,9 a 188,7 $\mu\text{g cm}^2$ (Fig. 5.1 A e B). Teores de ceras epicuticulares obtidos em estudo desenvolvido por Monquero et al. (2004) foram inferiores aos obtidos no presente estudo. Para as espécies *I. grandifolia*, *A. hybridus* e *C. benghalensis*, os teores obtidos foram de 37,0; 31,7 e 34,5 $\mu\text{g cm}^2$, respectivamente. Para a maioria das espécies vegetais, o teor de cera epicuticular normalmente varia de 10 a 200 $\mu\text{g cm}^2$ (MCWHORTER, 1994).

Os biótipos submetidos a condição hídrica de PMP responderam com um aumento significativo nas quantidades de ceras epicuticulares depositadas na folha comparado a condição hídrica CC (Fig. 5.1 A e B). Para a espécie *R. brasiliensis* o biótipo 283 (mais tolerante) apresentou maior variação no teor de ceras epicuticulares comparado com os demais biótipos, totalizando uma diferença de 100,2 $\mu\text{g cm}^2$ entre PMP e CC, enquanto o biótipo São Paulo (sensível) apresentou a menor diferença (Fig. 5.1 A). Evidenciou-se um incremento de 113% no depósito de ceras epicuticulares no PMP para o biótipo 283 e apenas 52% para o biótipo mais sensível. O biótipo 283 apresentou maior concentração de ceras em PMP com 188,67 $\mu\text{g cm}^2$, diferindo estatisticamente dos demais biótipos que não apresentaram diferenças significativas entre eles. Já para a condição de CC não evidenciou-se diferença estatística entre os biótipos de *R. brasiliensis*.

Para a espécie *B. latifolia*, no biótipo com maior tolerância ao glyphosate (biótipo 277), observou-se incremento de 66,3 $\mu\text{g cm}^2$ no teor de cera em condição de PMP, em comparação a CC, comparativamente às diferenças

constratadas nos biótipos São Paulo e 300, de 15 e 45,6 $\mu\text{g cm}^2$, respectivamente (Fig. 5.1 B). Essa elevação nos teores de ceras no biótipo 277 corresponde a um incremento de 105% no teor de ceras, enquanto que o biótipo São Paulo apresentou acréscimo de apenas 22,3%.

Entretanto, nas condições de CC e PMP o biótipo 277 apresentou menor deposição de cera em relação ao biótipo 300, porém, não evidenciou-se diferença estatística do mesmo com o biótipo São Paulo (maior sensibilidade ao herbicida) (Fig. 5.1 B).

Em condição de déficit hídrico, Scalcon (2013) verificou variações de 47,9 até 89,5 $\mu\text{g cm}^2$ em biótipos de *I. grandifolia*, conferindo a menor variação ao biótipo sensível e a maior ao biótipo tolerante, bem como no presente estudo. Diante disso, evidencia-se a existência de diferenças entre biótipos sensíveis e tolerantes ao glyphosate na capacidade de deposição de ceras epicuticulares sob diferentes regimes hídricos do solo (Fig. 5.1 A e B).

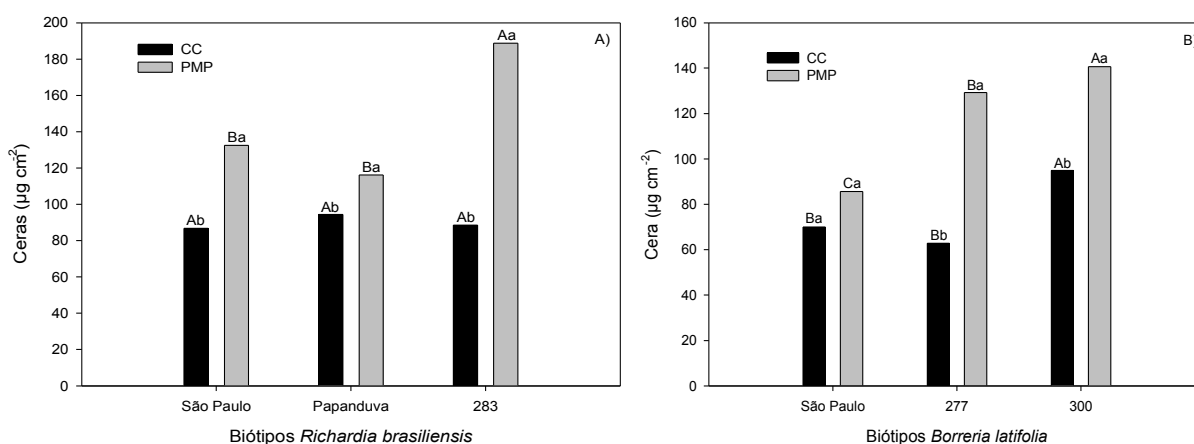


Figura 5.1 – Quantificação de cera epicuticular por área foliar em biótipos de *R. brasiliensis* (A) e *B. latifolia* (B), com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate (sensível, moderadamente tolerante e tolerante) submetidos a dois regimes hídricos (CC = 80% da umidade da Capacidade de Campo e PMP = umidade próxima ao Ponto de Murcha Permanente). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p= 0,05$), minúsculas comparam condições hídricas dentro de cada biótipo e maiúsculas comparam biótipos dentro de cada condição hídrica.

A resposta morfofisiológica detectada nos biótipos mais tolerantes das duas espécies pode estar relacionada à menor absorção do herbicida glyphosate e caracterizar dessa forma, o mecanismo que confere maior tolerância ao herbicida. No entanto, é importante destacar que as diferenças entre biótipos se manifestam

principalmente na condição de PMP, enquanto poucas diferenças nos teores de ceras ocorrem sob CC. No presente experimento, o fator determinante para a maior ou menor deposição foi o déficit hídrico imposto, uma vez que em todos os biótipos avaliados a quantidade de ceras epicuticulares foi inferior sob condição de disponibilidade de água próximo a CC, em comparação à condição de PMP.

A morfologia da superfície das folhas é influenciada pelas condições ambientais (déficit hídrico, vento, temperatura e umidade), provocando alterações na quantidade e nos tipos de ceras (HARTZLER, 2001; VIDAL e MEROTTO, 2001). As ceras da membrana cuticular das plantas tem como função a proteção contra a perda de água, transpiração excessiva, radiação solar, entrada de produtos químicos, contaminantes e ataque de patógenos (HEREDIA et al., 1998). As plantas possuem capacidade de formar maior quantidade de cera na superfície da folha quando estão sob estresse hídrico, evitando assim perda de água por evaporação (VIDAL, 2002). Em função do seu caráter predominantemente lipofílico, as ceras epicuticulares constituem a barreira mais significativa para a absorção via foliar de formulações de herbicidas com caráter hidrofílico, como o glyphosate (OLIVEIRA Jr.; BACARIN (2011). Em alguns casos, apenas 6% do total de glyphosate aplicado é absorvido.

No presente estudo, não foi realizada análise da composição química das ceras quantificadas, não permitindo determinar os principais grupos funcionais que as compõem, o que permitiria concluir se as ceras epicuticulares das duas espécies estudadas apresentam características mais hidrofílicas ou lipofílicas que possam vir a prejudicar a absorção de glyphosate.

Com o objetivo de caracterizar a superfície foliar e a composição das ceras epicuticulares das plantas daninhas *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus*, correlacionando-as com a absorção diferencial do glyphosate, Monquero et al. (2004) evidenciaram que para a espécie *C. benghalensis* as ceras epicuticulares possuíram na sua composição n-alcenos, que são compostos altamente hidrofóbicos (apolares), dificultando assim a absorção de glyphosate, que é altamente hidrofílico. Algumas pesquisas demonstraram que a composição das ceras pode mudar com a idade das plantas. Em *Sorghum halepense*, alcenos e ácidos aumentaram, enquanto houve diminuição de álcoois em ceras de folhas mais velhas (MCWORTER; OUZTS,

1993). Portanto, pode-se correlacionar o fato de *C. benghalensis* ser mais tolerante ao glyphosate quando adulta com uma maior quantidade de alcanos nas folhas maduras (MONQUERO et al., 2004).

5.3.2 Resposta dos biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* ao herbicida glyphosate sob dois regimes hídricos distintos

Nas Tabelas 5.1 e 5.2 constam os valores dos parâmetros das equações logísticas de três parâmetros, ajustadas para as variáveis respostas controle aos 14 e 28 DAA (Tab. 5.1) e MPAV e MPAS (Tab. 5.2) para os biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* em resposta a aplicação de doses do herbicida glyphosate.

No estudo em que foi avaliada a resposta de biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* ao herbicida glyphosate sob dois regimes hídricos distintos, houve significância ($p < 0,05$) para a interação tri-fatorial (doses x biótipos x regimes hídricos) para ambas as espécies. As figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 mostram a resposta dos biótipos de *R. brasiliensis* e *B. latifolia* a distintas doses de glyphosate, sob os dois regimes hídricos.

O biótipo 283 de *R. brasiliensis*, considerado tolerante ao glyphosate, apresentou a menor porcentagem de controle em relação aos demais biótipos quando submetido a condição hídrica próximo ao PMP (Fig. 5.2 A e B). Aos 14 DAA (Fig. 5.2 A), para a condição hídrica de CC houve 100% de controle para o biótipo São Paulo (sensível) na maior dose 792 g ha⁻¹ de e.a., enquanto os biótipos 283 e Papanduva (com tolerância intermediária) apresentaram níveis de controle de 67% e 78%, respectivamente. Na condição hídrica PMP, os biótipos sensível, 283 e Papanduva apresentaram níveis de controle de 70, 40 e 50%, respectivamente.

Tabela 5.1 - Parâmetros das equações ajustadas para a variável resposta controle dos biótipos de *B. Latifolia* e *Richardia brasiliensis* submetidos a condições hídricas do solo (CC e PMP) em resposta a aplicação de doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Espécie	Biótipo	CHS	DAA	Parâmetros			
				a	b	X ₀	R ²
<i>B. latifolia</i>	277	CC	14	61,09	89,73	228,25	0,98
	300			175,85	165,64	86,21	0,99
	SP			63,23	76,63	161,08	0,97
<i>B. latifolia</i>	277	PMP	28	38,47	48,42	131,35	0,98
	300			46,98	60,8	153,96	0,96
	SP			59,94	50,08	114,97	0,98
<i>B. latifolia</i>	277	CC	14	99,75	69,28	154,97	0,97
	300			101,21	66,85	138,7	0,96
	SP			100,53	62,03	126,68	0,96
<i>B. latifolia</i>	277	PMP	28	90,06	67,46	173,5	0,98
	300			77,55	93,34	163,74	0,92
	SP			95,69	55,46	130,81	0,98
<i>R. brasiliensis</i>	283	CC	14	66,17	63,66	252,83	0,99
	Papanduva			78,75	104,52	270,79	0,98
	SP			99,28	126,95	234,85	0,94
<i>R. brasiliensis</i>	283	PMP	28	49,16	89,11	208,52	0,98
	Papanduva			49,12	88,74	207,41	0,98
	SP			70,35	96,74	197,77	0,94
<i>R. brasiliensis</i>	283	CC	14	96,84	37,33	147,55	0,99
	Papanduva			94,24	42,17	83,06	0,95
	SP			95,5	24,82	70,05	0,97
<i>R. brasiliensis</i>	283	PMP	28	92,83	107,77	344,69	0,98
	Papanduva			96,01	59,26	159,75	0,98
	SP			87,88	22,47	65,67	0,9

Equação logística de três parâmetros. CHS= Condição hídrica do solo. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, x₀ ou C₅₀= Dose que proporciona 50% de controle. Valores ajustados pelo programa SigmaPlot.

Aos 28 DAA (Fig. 5.2 B), constatou-se incremento muito significativo nos níveis de controle tanto em CC quanto em PMP, em relação à avaliação anterior. Os biótipos São Paulo e Papanduva atingiram níveis de controle de 100%, já o biótipo 283 apresentou 90% de controle na condição hídrica CC com o emprego da maior dose de glyphosate (792 g ha⁻¹ de e.a.). Em resposta a condição hídrica do solo em PMP, a dose de 360 g ha⁻¹ de e.a. resultou níveis de controle de 88% para os biótipos São Paulo e Papanduva e de apenas 48% para o biótipo 283. Já para a maior dose, houve controle de 100, 91 e 100% na condição hídrica PMP para os biótipos São Paulo, 283 e Papanduva, respectivamente.

Tabela 5.2 - Parâmetros das equações ajustadas para a variável massa da parte aérea verde (MPAV) e seca (MPAS) para biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* submetidos a condições hídricas do solo (CC e PMP) em resposta a aplicação de doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Espécie	Biótipo	Variável	CHS	Parâmetros			
				a	b	X ₀	R ²
<i>B. latifolia</i>	277	MPAV	CC	100,07	1,42	258,91	0,98
	300			99,19	0,99	143,81	0,98
	SP			99,67	1,52	110,18	0,93
<i>B. latifolia</i>	277	MPAV	PMP	100,29	0,87	456	0,93
	300			100,37	0,89	308,65	0,99
	SP			99,73	0,76	157,48	0,99
<i>R. brasiliensis</i>	283	MPAV	CC	102,9	2,12	244,63	0,99
	Papanduva			99,82	1,13	43,54	0,98
	SP			99,96	1,14	34,36	0,99
<i>R. brasiliensis</i>	283	MPAV	PMP	100,51	0,69	697,12	0,93
	Papanduva			101,72	0,82	528,07	0,95
	SP			99,62	1,13	70,45	0,97
<i>B. latifolia</i>	277	MPAS	CC	100,58	1,21	381,2	0,99
	300			101,29	1	158,53	0,95
	SP			100,04	0,68	42,91	0,99
<i>B. latifolia</i>	277	MPAS	PMP	100,52	0,75	840,57	0,93
	300			100,98	0,77	387,71	0,97
	SP			99,78	0,94	137,03	0,99
<i>R. brasiliensis</i>	283	MPAS	CC	100,48	0,73	543,25	0,98
	Papanduva			95,48	2,58	245,69	0,97
	SP			100,22	1,3	85,26	0,99
<i>R. brasiliensis</i>	283	MPAS	PMP	102,22	1,4	1054,8	0,93
	Papanduva			101,76	0,79	397,9	0,93
	SP			98,4	1,37	139,25	0,95

Equação logística de três parâmetros. CHS= Condição hídrica do solo. A= Assíntota máxima, B= declividade da curva, x₀ ou C₅₀= Dose que proporciona 50% de redução da MPAV e MPAS. Valores ajustados pelo programa SigmaPlot.

Os biótipos de *B. latifolia* testados apresentaram resposta diferenciada aos dois regimes hídricos a que foram submetidos (Fig. 5.3 A e B). Na condição de PMP, o biótipo 277 (tolerante) exibiu os menores níveis de controle aos 14 e 28 DAA, de 40 e 73%, respectivamente, com a utilização da maior dose de glyphosate testada (792 g ha⁻¹ de e.a.).

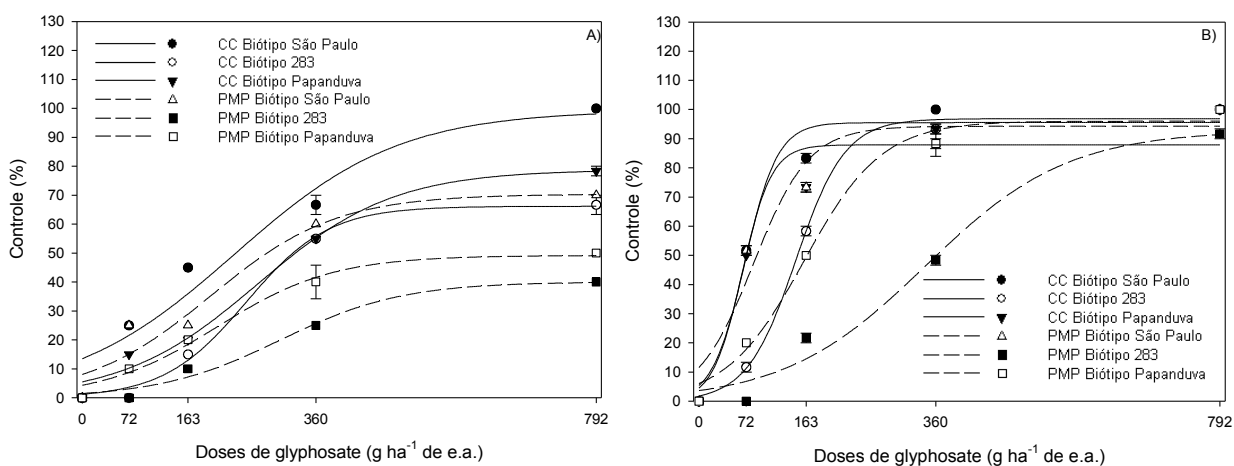


Figura 5.2 - Níveis de controle de plantas de biótipos de *R. brasiliensis* a doses de glyphosate aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A condição hídrica CC proporcionou níveis de controle mais elevados que PMP à medida que aumentaram-se as doses de glyphosate. Nessa condição, para a dose 360 g ha⁻¹ de e.a. houve 90% de controle do biótipo São Paulo (sensível), 68% de controle no biótipo 300 (tolerância intermediária), e 55% de controle no biótipo 277 (Fig 5.3 B). Já com o emprego da dose de 792 g ha⁻¹ de e.a. houve incremento nos níveis de controle, atingindo 100, 73 e 78% de controle para os biótipos São Paulo, 277 e 300, respectivamente.

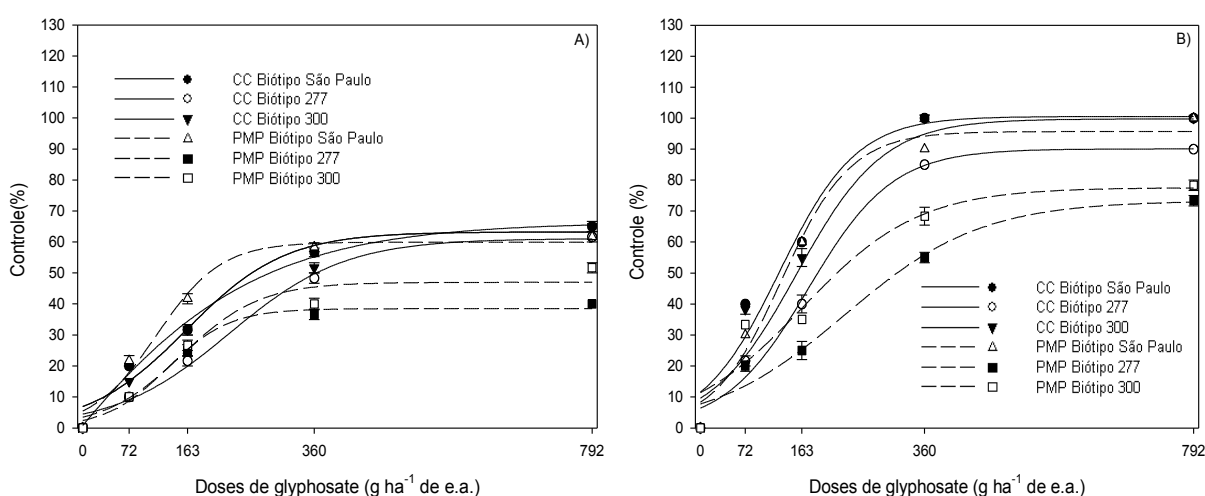


Figura 5.3 - Níveis de controle de plantas de biótipos de *B. latifolia* a doses de glyphosate aos 14 DAA (A) e 28 DAA (B) sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O incremento das doses de glyphosate resultou na redução de MPAV e

MPAS das plantas dos biótipos de *R. brasiliensis* (Fig. 5.4 A e B) e *B. latifolia* (Fig. 5.5 A e B). (Fig. 5.4 A e B). As reduções de MPAV e MPAS com o uso de 792 g ha⁻¹ de e.a. de glyphosate em plantas dos biótipos de *R. brasiliensis* São Paulo, 283 e Papanduva na condição hídrica CC foram de 98, 87 e 98,3% e 90, 54 e 89%, respectivamente. Na condição hídrica PMP essas reduções foram de 98, 48 e 54% e 91, 37 e 57% para os biótipos São Paulo, 283 e Papanduva para MPAV e MPAS, respectivamente para a mesma dose supracitada.

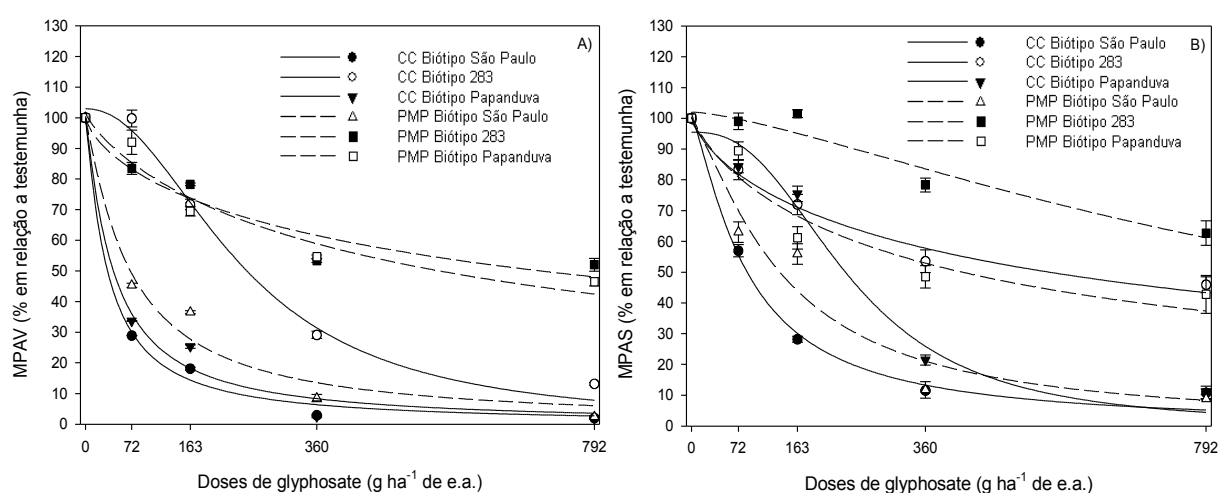


Figura 5.4 – Massa da parte aérea verde (MPAV) (A) e massa da parte aérea seca (MPAS) de biótipos de *R. brasiliensis* em resposta a doses de glyphosate sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Para a espécie *B. latifolia*, o biótipo 277 apresentou menores reduções de MPAV (Fig. 5.5 A) e MPAS (Fig. 5.5 B) para ambas as condições hídricas, sendo que a condição CC foi a que provocou maiores reduções comparativamente ao PMP. As reduções de MPAV e MPAS com o uso de 792 g ha⁻¹ de e.a. de glyphosate em plantas dos biótipos de *B. latifolia* São Paulo, 277 e 300 na condição de CC foram de 93, 87 e 90% e 86, 86 e 74%, respectivamente. As reduções de MPAV e MPAS com o emprego da dose de 792 g ha⁻¹ de e.a. para a condição hídrica de PMP para os biótipos São Paulo, 277 e 300 totalizaram 79, 58 e 68% e 83, 45 e 60%, respectivamente.

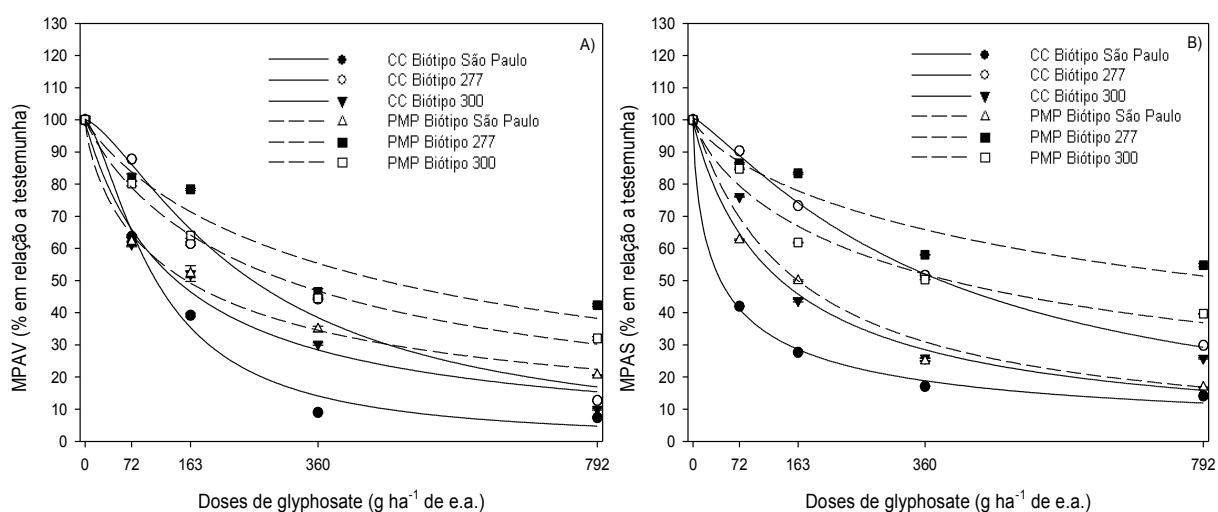


Figura 5.5 - Massa da parte aérea verde (MPAV) (A) e massa da parte aérea seca (MPAS) de biótipos de *B. latifolia* em resposta a doses de glyphosate sob regimes hídricos próximo a capacidade de campo (CC) e ponto de murcha permanente (PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Observou-se grande variação nos valores de GR_{50} para os biótipos de *R. brasiliensis* (Tab. 5.3) e *B. latifolia* (Tab. 5.4), entre 42,9 a 1054,8 $g\ ha^{-1}$ de e.a., considerando ambas condições de umidade no solo. Houve incremento do GR_{50} na condição de déficit hídrico para ambas as espécies, porém, esse incremento foi maior nos biótipos com maior tolerância, totalizando 1054,8 $g\ ha^{-1}$ de e.a. para o biótipo 283 de *R. brasiliensis* (Tab. 5.3) e 840,6 $g\ ha^{-1}$ de e.a. para o biótipo 277 de *B. latifolia* (Tab. 5.4). Nas duas condições de umidade do solo os biótipos tolerantes apresentaram maiores valores de GR_{50} , o que está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios prévios de dose resposta, efetuados para a diferenciação de biótipos com níveis de tolerância contrastantes.

Tabela 5.3 – Valores de GR_{50} para biótipos de *R. brasiliensis* submetidos próximos a CC e PMP em resposta a doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	CC	PMP
	GR_{50}	GR_{50}
São Paulo	85,2	139,3
283	543,3	1054,8
Papanduva	245,7	397,9

GR_{50} : dose necessária para reduzir 50% matéria seca da parte aérea.

Tabela 5.4 – Valores de GR₅₀ para biótipos de *B. latifolia* submetidos próximos a CC e PMP em resposta a doses do herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	CC	PMP
	GR ₅₀	GR ₅₀
São Paulo	42,9	137,03
277	381,2	840,6
300	158,5	387,7

GR₅₀: dose (g ha⁻¹ de e.a.) necessária para reduzir 50% matéria seca da parte aérea.

Houve correlação positiva entre a quantidade de ceras epicuticulares e o GR₅₀ para a espécie *B. latifolia*, nas duas condições de disponibilidade hídrica do solo (CC e PMP) (Tab. 5.5). Para a espécie *R. brasiliensis* houve correlação positiva apenas na condição de PMP.

A correlação positiva expressa dificuldade de controle com glyphosate à medida que os teores de cera epicuticular são incrementados. A eficiência do glyphosate é dependente de processos como a retenção do herbicida na superfície foliar, bem como a penetração foliar e translocação do herbicida na planta que causará a inibição da enzima alvo (KIRKWOOD e MCKAY, 1994). A translocação é um processo essencial para a boa eficácia do herbicida (WANAMARTA e PENNER, 1989). Desta maneira, a absorção e a metabolização também podem afetar a susceptibilidade de uma planta ao glyphosate, desta forma explicando os controles obtidos para o biótipo sensível.

Tabela 5.5 – Coeficientes de correlação entre as variáveis quantidade de ceras e dose necessária para reduzir 50% matéria seca da parte aérea (GR₅₀) para as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* em resposta a duas condições de disponibilidade de água no solo (CC e PMP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Biótipos	CC	PMP
	Ceras x GR ₅₀	Ceras x GR ₅₀
<i>B. latifolia</i>	0,85*	0,88*
<i>R. brasiliensis</i>	0,06 ^{n.s.}	0,88*

Plantas da espécie *Cyperus rotundus* L. submetidas a umidade de 30 e 45% da capacidade de saturação do solo manifestaram estresse hídrico, o que dificultou a absorção e translocação do herbicida halosulfuron e, conseqüentemente, resultou em menor fitointoxicação (MACHADO et al., 2000).

O nível de controle 7 dias após a aplicação de 180 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate sobre plantas de *Euphorbia heterophylla* em condição de boa umidade

do solo foi de 24%, enquanto na condição de menor umidade o controle decresceu para 3,5% (ZANATTA et al., 2007).

No estudo desenvolvido para quantificar os teores de ceras epicuticulares nesse capítulo, constatou-se que os biótipos tolerantes depositaram maiores quantidade de ceras comparado com os biótipos suscetíveis e de moderada tolerância (Fig. 5.2 A e B) para ambas as espécies, podendo justificar o menor controle do biótipo tolerante 283 (Fig. 5.3 A e B) e 277 (Fig. 5.4 A e B) ao herbicida glyphosate quando submetidos as condições hídricas CC e PMP.

Devido às diferenças de constituição da maior parte das ceras epicuticulares (lipofílicas) e do glyphosate (hidrofílico), as ceras ganham mais importância já que, segundo Oliveira Jr. e Bacarin (2011), as ceras epicuticulares constituem a barreira mais significativa para a absorção via foliar de formulações de herbicidas com caráter hidrofílico. Em alguns casos, apenas 6% do total de glyphosate aplicado é absorvido.

As plantas possuem capacidade de formar maior quantidade de cera na superfície da folha quando estão sob estresse hídrico, evitando assim perda de água por evaporação (VIDAL, 2002). Em estudo realizado por Hatterman-Valenti et al. (2006), foi possível verificar que estresse ambiental, como a seca combinada com baixa temperatura, aumentou o conteúdo de ceras epicuticulares nas folhas de *Setaria faberi*, sendo que com a redução da intensidade luminosa houve diminuição do teor das ceras. Além disso, verificaram que, em condições de estresse hídrico, diminuiram os ácidos graxos e álcoois primários, enquanto o teor de hidrocarbonetos aumentou. Essa mudança na composição tornou as ceras mais hidrofóbicas, reduzindo a absorção do herbicida fluazifop-P-butyl. Plantas de *Abutilon theophrasti* que cresceram em condições de seca ou baixa temperaturas apresentaram maior deposição de cera epicuticular na folha se comparado com às plantas que cresceram em solo com umidade na capacidade de campo ou alta temperatura (HATTERMAN-VALENTI et al., 2011). Essa elevação na produção de ceras tanto na presente tese, como no estudo supracitado, pode representar grande impacto na absorção de herbicidas.

Diante dos resultados apresentados, evidencia-se que a quantidade de água disponível ao crescimento das plantas pode interferir de forma relevante no

controle químico das ervas daninhas. Quando são realizadas aplicações sobre plantas em estresse hídrico, existe a tendência de ocorrer um decréscimo no controle, que poderá variar conforme os níveis do estresse.

5.4 CONCLUSÕES

A produção de ceras epicuticulares foi incrementada pelo déficit hídrico, com maior ênfase nos biótipos mais tolerantes ao glyphosate tanto para a espécie *Richardia brasiliensis* quanto para *Borreria latifolia*.

Houve correlação significativa entre tolerância do biótipo ao glyphosate e sua capacidade de deposição de cera epicuticular sobre as folhas quando submetidos a estresse hídrico.

6 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL EM BIÓTIPOS DE ERVA-QUENTE E POAIA-BRANCA COM RESPOSTAS DISTINTAS AO GLYPHOSATE

RESUMO

As espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* se desenvolvem em todo o país de forma espontânea. A variabilidade genética em plantas daninhas pode ser analisada entre plantas dentro da população (Intrapopulacional) ou entre plantas de populações distintas (interpopulacional). Conhecer a variabilidade genética de populações de plantas daninhas fornece subsídios para o manejo adequado visando o seu controle. O objetivo do trabalho foi avaliar variabilidade genética entre indivíduos dentro de duas populações, uma sensível e outra tolerante ao glyphosate, pertencentes às espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, utilizando marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). O DNA genômico de oito indivíduos de *B. latifolia* (4 sensíveis e 4 tolerantes) e *R. brasiliensis* (4 sensíveis e 4 tolerantes) foi extraído e a amplificação dos fragmentos foi realizada por PCR (Polymerase chain reaction) utilizando 20 iniciadores RAPD. Os índices PIC (conteúdo de informação polimórfica), MI (índice do marcador) e RP (poder de resolução) foram calculados para determinar os iniciadores RAPD mais informativos para os estudos da variabilidade genética de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. A similaridade genética entre os indivíduos foi calculada com base no coeficiente de Jaccard e o dendrograma de similaridade entre os isolados a partir do método UPGMA. Dos 20 iniciadores testados para *B. latifolia*, 15% apresentaram bandas polimórficas entre os biótipos. O número total de fragmentos polimórficos e monomórficos foi de 36 e 4, respectivamente, com índice médio de polimorfismo de 90%. Os valores de PIC (conteúdo de informação polimórfica) oscilaram entre 0,31 à 0,47. Para *R. brasiliensis*, dos 20 iniciadores testados, 30% apresentaram bandas polimórficas entre os biótipos. O número total de fragmentos polimórficos e monomórficos foi de 65 e 9, respectivamente, com índice médio de polimorfismo de 84,4%. Os valores de PIC variaram de 0,34 a 0,40. Os marcadores RAPD foram satisfatórios em permitir a detecção de polimorfismo entre os indivíduos pertencentes a biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate. A similaridade genética entre indivíduos pertencentes a biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate é baixa, evidenciando dessa forma grande variabilidade genética entre os mesmos.

Palavras-chave: Diversidade genética. Marcador molecular. RAPD. *B. latifolia*. *R. brasiliensis*.

ABSTRACT

The *Borreria latifolia* and *Richardia brasiliensis* species are major weeds in Brazil. The genetic variability among weeds can be evaluated between plants within a

population (intrapopulation) or between plants of different populations (interpopulation). The knowledge on the genetic variability of weed populations helps to improve their management and control. The objective of this work was to evaluate the genetic variability among individuals using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers within two populations, one sensitive and one tolerant to glyphosate, in populations of *B. latifolia* and *R. brasiliensis*. The DNA of eight individuals of *B. latifolia* (4 sensitive and 4 tolerant) and *R. brasiliensis* (4 sensitive and 4 tolerant) was extracted and the amplification of the fragments was performed by PCR (Polymerase chain reaction) using 20 RAPD primers. The indexes PIC (polymorphic information content), MI (marker index) and RP (resolution power) were calculated to determine the most informative RAPD primers for the genetic variability studies of *B. latifolia* and *R. brasiliensis*. The genetic similarity between the individuals was calculated using the Jaccard coefficient and the dendrogram of similarity between the isolates from the UPGMA method. From the 20 *B. latifolia* tested primers, 15% presented polymorphic bands among the biotypes. The total number of polymorphic and monomorphic fragments was 36 and 4, respectively, with a polymorphism index of 90%. The values of PIC ranged from 0.31 to 0.47. For the 20 *R. brasiliensis* tested primers, 30% presented polymorphic bands among the biotypes. The total number of polymorphic and monomorphic fragments was 65 and 9, respectively, with a polymorphism index of 84.4%. The PIC values ranged from 0.34 to 0.40. The RAPD markers were satisfactory in allowing the detection of polymorphism among individuals in the *B. latifolia* and *R. brasiliensis* biotypes with contrasting responses to glyphosate. The genetic similarity between individuals belonging to *B. latifolia* and *R. brasiliensis* biotypes with contrasting responses to glyphosate was low, demonstrating a high genetic variability.

Keywords: Genetical diversity. Molecular marker. RAPD. *B. latifolia*. *R. brasiliensis*.

6.1 INTRODUÇÃO

O glyphosate é o herbicida mais utilizado mundialmente, em função do baixo preço pago pelos produtores, elevada eficiência e ampla e rápida adoção de culturas geneticamente modificadas (CGM) com resistência ao glyphosate pelos agricultores. Atualmente, o maior risco na adoção de CGM no Brasil e América do Sul deve-se à seleção de plantas daninhas com resistência e tolerância a herbicidas (CERDEIRA et al., 2010).

A tolerância de plantas daninhas aos herbicidas está disseminada do Norte ao Sul do Brasil (GALON et al., 2013). Em lavouras de soja da região Sul do país, espécies pertencentes à família Rubiaceae apresentam grande importância dentre as tolerantes ao herbicida glyphosate. Há fortes indícios que a dose necessária para controlar determinadas populações tolerantes esteja se deslocando

para um patamar superior, resultado de processo de seleção em que indivíduos que toleram doses mais elevadas sobrevivem e indivíduos mais sensíveis são eliminados.

A tolerância é uma característica existente na planta mesmo antes da aplicação do herbicida em uma área, ou seja, ela está relacionada com a habilidade da planta sobreviver e se reproduzir após o tratamento herbicida, mesmo sofrendo injúrias (CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

Existe grande variabilidade genética entre indivíduos na maioria das populações de plantas, sejam elas espécies daninhas ou cultivadas (RADOSEVICH et al., 1997). A variabilidade genética está presente em espécies de plantas daninhas, sendo considerada elevada entre plantas dentro da população (intrapopulacional) ou entre plantas de populações distintas (interpopulacional), apresentando potencial para adaptar-se ao manejo realizado para o seu controle. A variabilidade genética é de suma importância para a evolução, sucesso no estabelecimento e para a dispersão de sementes, sendo encontrada em espécies de plantas daninhas (SILVERSTOWN e LOVETT DOUST, 1993).

A espécie *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (erva-quente) é nativa do Brasil, ocorrendo com maior intensidade nas regiões Sudeste, Centro-oeste, Sul, Nordeste e também Norte, vegetando em áreas ocupadas por lavouras anuais e/ou perenes (KISSMANN e GROTH, 1995; MOREIRA e BRAGANÇA, 2010). É uma espécie herbácea, prostrada a ereta, ramificada, monoica, com flores actinomorfas e bissexuais (OLIVEIRA et al., 2014). Apresenta anteras oblongas com 1,8 a 2 mm comprimento; estigma bífido e estilete com 7 a 9 mm comprimento (SOUSA et al., 2013). A propagação dessa espécie ocorre via sementes e possui nítida preferência por solos pobres e ácidos, além de tolerar um certo grau de sombreamento, competindo assim com a cultura durante todo o ciclo (LORENZI, 2008).

Richardia brasiliensis (Gomes) (Poaia branca) é uma espécie herbácea, anual, prostrada (10 cm altura), monoica e que ocorre em todo o país de forma espontânea (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010; SOUSA et al., 2013). Apresenta flores monoclinas, homostílicas (um tamanho só de estiletos) e sésseis; anteras elipsoides com 1,5 a 2 mm de comprimento; estigma trífido e estilete com 3,8 a 4 mm de comprimento (SOUSA et al., 2013). Possui grande vigor vegetativo cobrindo

completamente o solo a semelhança de um tapete, sendo considerada umas das principais infestantes das culturas de soja e milho das regiões Sul e Centro-Oeste apresentando maior interferência no início dos ciclos de culturas de verão (LORENZI, 2008).

Essas espécies possuem características florais que permitem autogamia e alogamia na mesma planta, ou seja, o estilete é maior que as anteras, o que propicia a fecundação cruzada, dessa forma aumentando a variabilidade intraespecífica. Dentre as Angiospermas, a maior frequência de heterostilia ocorre na família Rubiaceae (ORNDUFF, 1974).

Biótipos resistentes e/ou tolerantes, que se reproduzem, preferencialmente por autofecundação (autógamas), apresentam velocidade de dispersão muito pequena, quando comparado a biótipos que apresentam fecundação cruzada (alógamas), pela dificuldade do fluxo de genes entre plantas vizinhas. No entanto, na maioria das espécies a resistência e/ou tolerância é transmitida pelo pólen, podendo atingir muitas plantas e assim se propagar mais rapidamente (VIDAL e FLECK, 1997; MATIELLO et al.,1999; GONÇALVES NETTO et al.,2016).

A biologia molecular vem se tornando uma importante ferramenta nos estudos com plantas daninhas, possibilitando desvendar possíveis casos de resposta diferencial entre biótipos da mesma espécie a determinado herbicida. Os marcadores moleculares são sequências específicas de DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos. Esta ferramenta molecular possibilitou identificar e diferenciar linhagens, híbridos, cultivares e espécies. Além disso, estimar o grau de parentesco, a diversidade e variabilidade genética, detectar polimorfismos a níveis de loci específicos, de locos de características quantitativas (QTLs) e ao nível da totalidade do genoma (BENKO-SEPPON et al., 2003; MOULIN et al., 2012; MIR e VARSHNEY, 2013).

As técnicas moleculares, como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), reação em cadeia da polimerase (PCR), polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) são técnicas bastante recomendadas, pois permitem estimar a variabilidade genética dentro e entre espécies de plantas.

Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) apresentam como característica básica a dominância, ou seja, este tipo de marcador não permite distinguir indivíduos homocigotos dominantes de heterocigotos em uma população. As vantagens da técnica RAPD são a simplicidade, pois é fácil de ser executada, a rapidez na obtenção de dados, custo relativamente reduzido, em relação a outras técnicas moleculares, e a aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. A técnica não exige sequenciamento prévio de nucleotídeos, nem desenho de iniciadores específicos e não requer o desenvolvimento prévio de bibliotecas de sondas específicas para o organismo de interesse (CAIXETA et al., 2009; MILACH, 1998). Em virtude disto, os marcadores RAPDs podem ser utilizados em análises genéticas em espécies cujo genoma pouco se conhece (CHAVAN et al., 2013; LIU et al., 2014). No estudo de populações de plantas daninhas, em *Echinochloa crusgalli* (capim-arroz), essa técnica foi utilizada para detectar diferenças na tolerância ao herbicida quinclorac (RUTLEDGE et al., 2000). Também em picão-preto, a similaridade genética entre acessos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS foi avaliada por RAPD (HERNANDES, 2004; LAMEGO et al., 2006). Foram avaliados os marcadores RAPD na espécie *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. para estudar a distância genética entre biótipos com respostas contrastantes ao herbicida fomesafen (DWIATI; SUSANTO, 2015).

O conhecimento de possíveis alterações moleculares tem importância fundamental para viabilizar técnicas de controle, podendo haver respostas diferenciadas de possíveis materiais à ação de herbicidas, reduzindo ou incrementando a eficiência de controle (VIEIRA, 2007).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar variabilidade genética entre biótipos de *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* sensíveis e com maior tolerância ao herbicida glyphosate, utilizando marcadores RAPD.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal

Foram utilizados dois biótipos para cada uma das espécies, com resposta contrastante ao herbicida glyphosate. Os biótipos 277 (*B. latifolia*) e 283 (*R. brasiliensis*), que apresentam maior tolerância ao herbicida glyphosate foram coletados em lavouras de soja, com histórico de uso do herbicida e que apresentavam elevada infestação das mesmas. Os biótipos sensíveis de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foram adquiridos junto à empresa Cosmos Agrícola Ltda., de São Paulo/SP.

6.2.2 Extração do DNA

O DNA de 16 indivíduos pertencentes a dois biótipos com respostas distintas ao glyphosate, das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco/PR. Os biótipos selecionados foram resultantes da avaliação descrita no Capítulo I da presente tese. As folhas foram coletadas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação anteriormente à aplicação de 360 g e.a. ha⁻¹, possibilitando assim a seleção das plantas com maior tolerância e sensibilidade ao herbicida. Como critério, as plantas individuais dos biótipos que apresentaram aproximadamente 100% de controle aos 28 dias após a aplicação (DAA) (biótipo São Paulo de ambas as espécies) foram consideradas sensíveis ao glyphosate. Plantas com maior tolerância foram selecionadas dentro de cada biótipo considerado tolerante (biótipo 277 de *B. latifolia* e 283 de *R. brasiliensis*) que apresentaram aproximadamente 0% de controle.

Procedeu-se a maceração das folhas das plantas, com o auxílio de almofariz e pistilo, até obtenção de um pó fino. Ao tubo com as folhas maceradas foi acrescentado 600 µl de tampão de extração (20mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,1 M de NaCl, 1% de CTAB, 0,4% de β-mercaptoetanol). Os tubos foram levados ao banho maria a 60 °C por 25 min. O DNA foi separado da solução por precipitação com clorofórmio álcool isoamílico (24:1) e centrifugação. Em seguida foram realizadas sucessivas lavagens com etanol para obtenção de um DNA limpo. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em tampão TE (Tris-EDTA) tratado com

RNase. O DNA obtido foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

6.2.3 Quantificação do DNA

A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital. A quantificação do DNA e identificação de possíveis contaminações por proteína foi realizada em espectrofotômetro. Para a quantificação do DNA, foram feitas leituras a 280 nm e para detecção de contaminação por proteínas foi analisada a relação de absorbância a 260 nm/280 nm em espectrofotômetro.

6.2.4 Amplificação do DNA

Para as análises moleculares foram utilizados 20 iniciadores RAPD disponíveis no GenBank (NCBI, 2015), escolhidos de acordo com estudos prévios englobando o maior número possível de espécies vegetais que obtiveram êxito em avaliações prévias (Tabela 6.1). Destes, foram testados e selecionados os iniciadores mais informativos para indivíduos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* pertencentes a biótipos com respostas distintas ao glyphosate.

As reações de amplificação do DNA de cada biótipo via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 μL contendo: 20 ng de DNA, 0,2 μM de iniciador, 200 μM de dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 e 1 U de Taq DNA Polimerase e tampão para PCR 1X. Para a amplificação, o termociclador foi programado para desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos iniciadores por 35°C por 1 minuto, e por fim um passo a 72°C por 2 minutos para extensão final dos fragmentos e incorporação de nucleotídeos. Este ciclo foi repetido 40 vezes, utilizando-se uma mudança de temperatura entre um passo e outro de 1°C por segundo. Após os 40 ciclos foi adicionado um passo para extensão de 5 minutos a 72°C , para finalizar os produtos amplificados.

Tabela 6.1 - Iniciadores RAPD utilizados para amplificação do DNA de oito biótipos de *B. latifolia* e oito biótipos de *R. brasiliensis* com resposta contrastante ao herbicida glyphosate. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Primer	Sequência	TA°C
OperonK14	CCCGCTACAC	34
OperonR13	GGACGACAAG	32
OperonM18	CACCATCCGT	32
OperonO06	CCACGGGAAG	34
OperonQ14	GGACGCTTCA	32
OperonA07	GAAACGGGTG	32
OperonM15	GACCTACCAC	32
OperonH07	CTGCATCGTG	32
OperonE18	GGACTGCAGA	32
OperonQ01	GGGACGATGG	34
OperonG03	GAGCCCTCCA	34
OperonO20	ACACACGCTG	32
OperonG06	GTGCCTAACC	32
OperonG05	CTGAGACGGA	32
OperonF09	CCAAGCTTCC	32
OperonB18	CCACGCAGT	32
OperonG02	GGCACTGAGG	34
OperonO10	TCAGAGCGCC	34
OperonM12	GGGACGTTGG	34
OperonD11	AGCGCCATTG	32

TA°C: temperatura de anelamento do primer em graus Celsius.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,8% a 80 V, usando corante fluorescente Blue Green loading dye I (LGC Biotecnologia). O resultado da eletroforese foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta V e fotodocumentado por sistema de captura digital. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 kpb (Ladder 1 KB - Ludwig Biotecnologia Ltda).

6.2.5 Análises estatísticas – RAPD

Somente foram considerados os fragmentos que apresentaram bom padrão de resolução. Os produtos de amplificação dos iniciadores RAPD polimórficos foram classificados visualmente quanto à presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos em análise, gerando uma matriz de dados binários. A porcentagem de polimorfismo de cada primer RAPD foi calculada dividindo o número de

fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados. Neste trabalho foram utilizados três índices para determinar os iniciadores RAPD mais informativos sendo: o PIC (conteúdo de informação polimórfica), o MI (índice do marcador) e RP (poder de resolução). O PIC foi calculado como proposto por Roldán-Ruiz et al. (2000):

$$\text{PIC} = 2 f_{i_1} (1 - f_{i_2})$$

Sendo: f_{i_1} = frequência dos fragmentos presentes no marcador no mesmo loco; $(1 - f_{i_2})$ = frequência dos fragmentos ausentes no marcador no mesmo loco.

O índice de marcador (MI) foi calculado de acordo com Varshney et al. (2007):

$$\text{MI} = \text{PIC} \times \text{EMR}$$

A relação efetiva múltipla (EMR) foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{EMR} = n \times \beta$$

Sendo: n = total de fragmentos de amplificação do iniciador / n° total de isolados analisados; β = número de fragmentos polimórficos / número de total de fragmentos amplificados.

O poder de resolução (RP), isto é, a distribuição de alelos pelos genótipos amostrados foi calculada de acordo com Prevost e Wilkinson (1999):

$$\text{RP} = \sum I_b$$

Sendo I_b calculado pela fórmula: $I_b = 1 - (2 |0,5 - p|)$ Sendo: p = proporção de indivíduos que contém o fragmento.

Após obtenção dos índices, foram calculadas as correlações entre PIC e MI, MI e RP, RP e PIC. A similaridade genética entre indivíduos de biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas distintas ao herbicida glyphosate foi estimada com base no coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando o software NTSYS 2.2 (Numerical Taxonomy Analyses System) (ROHLF, 2007) e o dendrograma de similaridade entre os biótipos para cada espécie estudada foi obtido pelo método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages”).

A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenética (r) (Sokal e Rohlf, 1962). A significância do coeficiente de correlação cofenética foi estimada pelo teste de Mantel com 1000 permutações

(MANTEL, 1967).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 *Borreria latifolia*

Entre os 20 iniciadores testados para os oito biótipos de *B. latifolia* (4 sensíveis e 4 tolerantes), apenas 3 iniciadores apresentaram bom perfil de amplificação. O número total de fragmentos amplificados pelos 3 iniciadores foi de 40, média de 13,3 fragmentos por iniciador (Tabela 6.2). O número de fragmentos polimórficos foi de 36 com índice médio de polimorfismo de 90%. A porcentagem de fragmentos amplificados variou de 66,7 para o primer Operon R13 a 100% para o primer OperonK14. O número de fragmentos amplificados por iniciador e a porcentagem de polimorfismo são apresentados na tabela 6.2. O maior número de fragmentos amplificados foi obtido com o primer OperonK14 (18 fragmentos) e o menor com OperonR13 (9 fragmentos). Evidencia-se que os iniciadores RAPD amplificaram fragmentos com tamanho individual de 1700 a 9900 pb (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Relação dos iniciadores RAPD utilizados em *Borreria latifolia*, com bom perfil de amplificação e seus respectivos parâmetros: Número total de fragmentos amplificados (NT), intervalo dos fragmentos (IF), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), índice de marcador (MI) e poder de resolução (RP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Iniciador	Produto de amplificação	NT	IF	%P	PIC	MI	RP
OperonK14	✓	18	2800-9900	100	0,36	1,82	0,56
OperonR13	✓	9	2400-5700	66,7	0,47	1,58	0,79
OperonM18	✓	13	1700-8500	92,3	0,31	1,44	0,46

Os valores de conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variaram entre 0,31 (OperonM18) a 0,47 (OperonR13) (Tabela 6.2). O índice de marcador (MI) variou entre 1,44 (OperonM18) a 1,82 (OperonK14), com média 1,61 (Tabela 6.2). Em relação ao poder de resolução (RP), houve variação entre 0,46 (OperonM18) a 0,79 (OperonR13), com média de 0,60 (Tabela 6.2).

Por meio da estimativa dos índices PIC, MI e RP, foi possível classificar o iniciador mais informativo, sendo o primer OperonR13 classificado como o mais

eficiente para separar os indivíduos pertencentes a biótipos de *B. latifolia* com respostas distintas ao glyphosate (Tabela 6.2).

A similaridade genética entre os oito biótipos de *B. latifolia* obtida a partir de 36 fragmentos polimórficos amplificados através de três iniciadores RAPD variou entre 0,25 e 0,82, com similaridade média entre todos os indivíduos de 0,43. No dendrograma obtido para os três iniciadores RAPD (Fig. 6.1) utilizando a similaridade média como ponto de corte, foi possível observar quatro grupos distintos, sendo que primeiro formado pelos indivíduos tolerantes 01 e 02. O segundo grupo foi composto unicamente pelo indivíduo sensível 02. O terceiro grupo formou três subgrupos, sendo o primeiro formado pelos indivíduos tolerante 03 e sensível 04, o segundo subgrupo constituiu-se com o indivíduo sensível 03 e o terceiro subgrupo pelo indivíduo tolerante 04. O quarto grupo formou-se pelo indivíduo sensível 01, esse permanecendo individualizado.

A correlação cofenética para *B. latifolia* foi de 0,92 possibilitando concluir que o método de agrupamento empregado no presente estudo foi adequado, ou seja, o grau de ajuste entre a matriz de similaridade original e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento foi apropriado. Segundo ROHLF e FISHER (1968) este valor é considerado bom, demonstrando que a representatividade das reais distâncias entre os indivíduos pertencentes a dois biótipos com respostas distintas ao glyphosate através da representação gráfica do dendrograma é confiável.

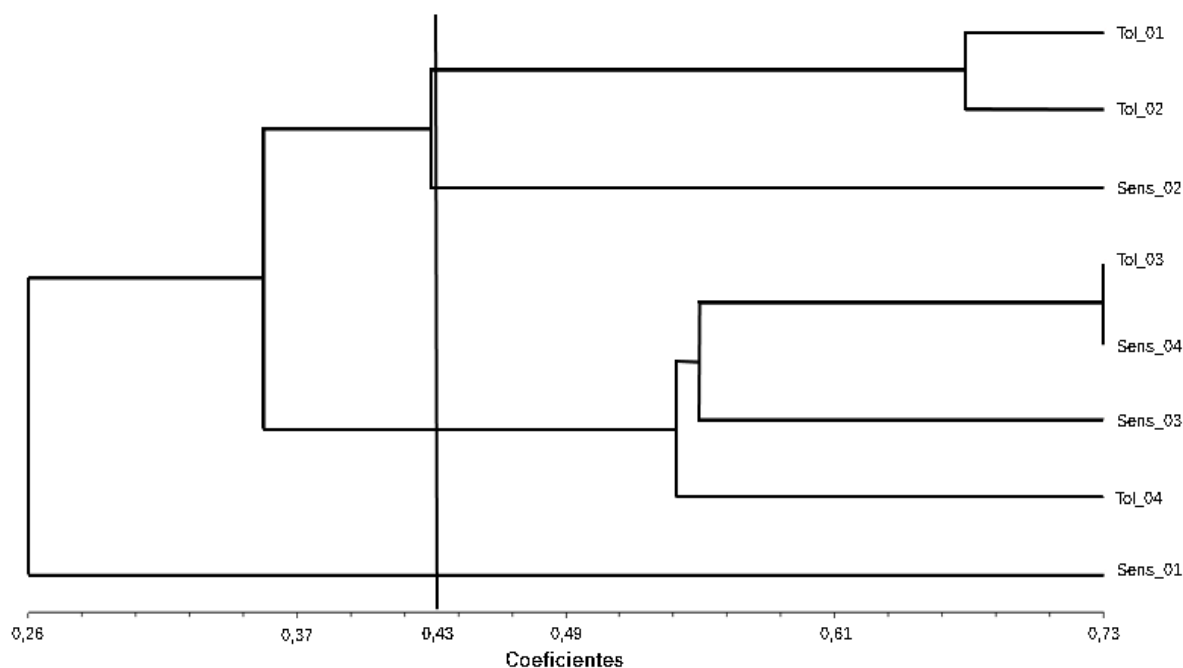


Figura 6.1 – Dendrograma dos oito indivíduos de *B. latifolia* (quatro tolerantes e quatro sensíveis), gerado com dados dos marcadores RAPD. A linha de corte indica a similaridade média de 0,43. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

6.3.2 *Richardia brasiliensis*

Seis entre os 20 iniciadores testados apresentaram bom perfil de amplificação para os oito indivíduos de *R. brasiliensis*. O número total de fragmentos amplificados pelos seis iniciadores foi de 74, média de 12,3 fragmentos por iniciador (Tabela 6.3). O número de fragmentos polimórficos foi de 65, com índice médio de polimorfismo de 88%. A porcentagem de fragmentos polimórficos variou de 40% para o primer OperonG02 a 100% para os iniciadores OperonK14, R13, M18 e A07. O maior número de fragmentos amplificados foi obtido com os iniciadores OperonR13 e A07 (16 e 15 fragmentos, respectivamente) e o menor com OperonQ01 (9 fragmentos). Os iniciadores amplificaram fragmentos com tamanho individual de 1200 a 9500 pb (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Relação dos iniciadores RAPD utilizados em *Richardia brasiliensis* com bom perfil de amplificação e seus respectivos parâmetros: Número total de fragmentos amplificados (NT), intervalo dos fragmentos (IF), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), índice de marcador (MI) e poder de resolução (RP). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Primer	Produto de amplificação	NT	IF	%P	PIC	MI	RP
OperonK14	✓	12	3500-9500	100	0,35	3,20	5,75
OperonR13	✓	16	2100-6000	100	0,37	3,88	8,5
OperonM18	✓	12	1600-6100	100	0,41	3,76	7,5
OperonA07	✓	15	2000-7900	100	0,39	3,64	9,25
OperonQ01	✓	9	2100-5200	67	0,36	2,22	3,25
OperonG02	✓	10	1200-5100	40	0,34	1,27	2,5

Os valores de PIC variaram de 0,34 (OperonG02) a 0,41 (OperonM18), com valor médio de 0,37 (Tabela 6.3). Evidenciou-se variação de MI entre 1,27 (Operon G02) a 3,88 (OperonR13), com média de 3. O RP variou entre 2,5 (OperonG02) e 9,25 (OperonA07), com média de 6,13 (Tabela 6.3).

A similaridade genética entre os oitos indivíduos pertencentes a dois biótipos de *R. brasiliensis*, obtida a partir de 65 fragmentos polimórficos amplificados através de 6 iniciadores RAPD oscilou entre 0,21 e 0,87, com similaridade média entre todos os indivíduos de 0,49. No dendrograma obtido para os seis iniciadores RAPD (Fig. 6.2) evidenciou-se a formação de 2 grandes grupos. No grupo I, houve a formação de um subgrupo com os indivíduos sensíveis (01 e 02 - muito similares entre si) e o indivíduo tolerante 1, e outro composto unicamente pelo indivíduo tolerante 03. No subgrupo II houve a formação de um subgrupo composto pelos indivíduos sensível 01 e 03 e tolerante 04. O grupo II formou-se unicamente pelo indivíduo tolerante 2 (Fig. 6.2).

A correlação cofenética para *R. brasiliensis* foi de 0,90, possibilitando concluir que o método de agrupamento empregado no presente estudo foi adequado. Segundo Rohlf; Fisher (1968) este valor é considerado bom, demonstrando que a representatividade das reais distâncias entre os indivíduos através da representação gráfica do dendrograma é confiável.

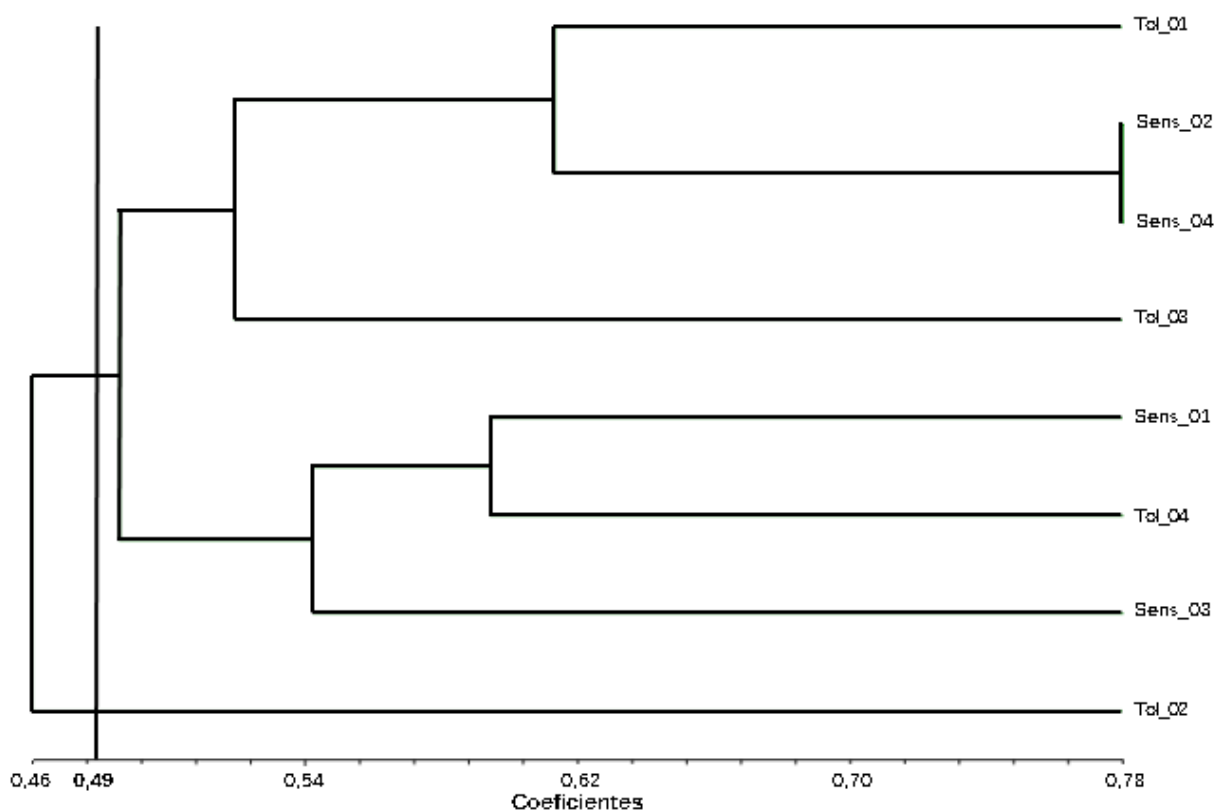


Figura 6.2 – Dendrograma dos oito indivíduos de *R. brasiliensis* (tolerantes e sensíveis) gerado com dados dos marcadores RAPD. A linha de corte indica a similaridade média de 0,49. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

6.3.3 Discussão

Os melhores iniciadores para *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foram OperonR13 e OperonM18; A07, respectivamente para o valor de PIC. O valor de PIC de cada marcador é representado pela probabilidade do marcador estar presente ou ausente em dois indivíduos aleatórios da população (ROLDÁN-RUIZ et al., 2000). Os valores de PIC variam de zero a 0,5 para marcadores presentes em 50% dos genótipos e ausentes nos outros 50%. O parâmetro PIC comprova a existência de variabilidade genética, ou seja, quanto mais próximo de 0,50 for o valor de PIC, maior será a capacidade do primer em diferenciar indivíduos de um grupo, bem como possibilita estimar a variabilidade genética dentro e entre populações (ROLDÁN-RUIZ et al., 2000).

Para o presente estudo, observou-se que os melhores iniciadores

considerando o MI foram OperonK14, para *B. latifolia* e OperonR13 e M18, para *R. brasiliensis*. Segundo Tatikonda et al. (2009), não há um valor ideal para MI, assim pode-se analisar os resultados desse índice comparando os valores de cada primer utilizado no estudo, os melhores serão sempre os que apresentarem os maiores valores. Para a obtenção do valor de MI, os valores de PIC são levados em consideração e são multiplicados pelo índice que considera o número total de fragmentos e o número de fragmentos polimórficos, considerando a média entre os níveis de polimorfismo e a capacidade de identificação de locos polimórficos, mostrando que o MI é o índice que mede a utilidade do marcador (VARSHNEY et al., 2007).

Os iniciadores que apresentaram melhores valores de RP para *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foram OperonR13 e OperonR13; A07, respectivamente. O cálculo de RP considera indiretamente o número de fragmentos polimórficos de um iniciador e a quantidade de indivíduos em que esses fragmentos estão presentes. O RP do primer apresenta várias aplicações, sendo a mais importante a capacidade de separar indivíduos dentro de uma população. Para este índice não há um valor máximo estabelecido, portanto, quanto maior for o valor de RP, maior será o poder de distinção entre os indivíduos (PREVOST; WILKINSON, 1999).

Segundo TATIKONDA et al. (2009), os índices PIC, MI e RP são importantes e eficientes na identificação de iniciadores mais informativos. Para *B. latifolia*, a utilização dos índices PIC, MI e RP permitiu selecionar um iniciador RAPD mais informativo (OperonR13) entre os 3 iniciadores que amplificaram, para avaliar os biótipos com respostas contrastantes ao glyphosate (Tabela 6.2). Já para *R. brasiliensis* foi possível selecionar os iniciadores Operon R13, M18 e A07 entre os 6 iniciadores que amplificaram, para avaliar os biótipos com respostas contrastantes ao glyphosate (Tabela 6.3).

Poucos iniciadores amplificaram, porém, possibilitaram identificar as divergências genéticas que existem entre os indivíduos. O fato de que os quatro indivíduos com maior tolerância tenham sido selecionados a partir do biótipo tolerante (mesmo local) e os quatro sensíveis do biótipo sensível de cada espécie terem sido originados do mesmo biótipo (mesmo local) evidencia a existência de elevada dissimilaridade entre os mesmos. Os valores para a similaridade genética

entre os indivíduos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* foi de 43 e 49%, respectivamente, valores muito baixos comparados com as similaridades de espécies cultivadas, devido ao fato que, nas espécies cultivadas o melhoramento genético propicia homogeneidade entre os indivíduos. A similaridade genética para a cultura do trigo foi de 73% (FREITAS et al., 2000). Para a cultura do arroz, a similaridade genética encontrada foi de 97% para a variedade crioula Bacabinha (AREIAS et al., 2006). A similaridade genética para cultivares de morango Santa Clara e Vila Nova foi de 98% (RADMANN et al., 2006). A baixa similaridade genética observada no grupo de genótipos estudado era esperada, uma vez que as espécies daninhas apresentam elevada variabilidade genética entre plantas de uma população ou entre populações, uma vez que se desenvolvem e evoluem em múltiplos ambientes, com grande potencial para se adaptar ao manejo empregado no seu controle (HOLT & HOCHBERG, 1997; WINKLER et al., 2002; RADOSEVICH et al., 2007).

Resultado semelhante para similaridade genética foi obtido para *E. heterophylla* com valor de distância genética máximo de 39% (VASCONCELOS et al., 2000). A similaridade genética foi avaliada em populações de *E. heterophylla* resistentes aos inibidores da ALS, equivalendo a 40% (WINKLER et al., 2003). Para *Echinochloa crus-galli* foi verificada distância genética de 43% entre 16 populações selecionadas (RUTLEDGE et al., 2000). Por outro lado, acessos de *Eichornia crassipes* (aguapé) apresentaram similaridade genética de 90%, considerada alta, o que pode ser explicado pela forma de propagação vegetativa, que contribui para menor possibilidade de recombinação genética (CARDOSO et al., 2002). Lamego et al. (2006) concluíram que a similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes e suscetíveis aos inibidores da enzima ALS, coletados no Estado do Paraná foi baixa (37%), a distâncias conhecidas, evidenciaram também que não há relação entre variabilidade genética e distância geográfica para os acessos de picão-preto avaliados. A variabilidade genética é um requisito para a evolução, o sucesso no estabelecimento e a dispersão de plantas daninhas (SILVERSTOWN; LOVETT DOUST, 1993).

As espécies estudadas apresentam heterostilia, o que favorece a alogamia, podendo explicar a variabilidade intraespecífica e dissimilaridade genética nessas espécies. O termo heterostilia é um polimorfismo floral complexo controlado

geneticamente, onde as populações são compostas por duas ou três formas florais que diferem reciprocamente nas alturas de seus estigmas e anteras (BARRETT, 1992), interpretado como um mecanismo que promove a polinização cruzada através de diferenciação de estiletes curtos e estames longos (LI; JOHNSTON, 2001; GANDERS, 1979). A maior frequência de espécies com heterostilia em Angiospermas ocorre na família Rubiaceae (ORNDUFF, 1974).

Biótipos resistentes e/ou maior tolerância que se reproduzem preferencialmente pela autofecundação (autógamas) apresentam velocidade de dispersão muito pequena, quando comparado a biótipos que apresentam fecundação cruzada (alógamas), em função da dificuldade do fluxo de genes entre plantas vizinhas. Por se tratar de duas espécies que apresentam alogamia e pelo fato da tolerância ao herbicida ser geralmente condicionada por mutações de ponto, que não é detectável por este tipo de marcador, é razoável considerar que tanto indivíduos tolerantes e sensíveis pertencerem ao mesmo grupo nos dendrogramas, devido à grande variabilidade dentro das populações.

Através da técnica RAPD foi possível estimar a variabilidade genética existente dentro e entre indivíduos pertencentes a biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. Como a variabilidade genética em ambas as espécies estudadas é elevada, poderão ocorrer diferenças em níveis de sensibilidade a métodos de controle entre diferentes indivíduos dentro da população. Para se obter controle em áreas infestadas com a presença de espécies com maior tolerância ao herbicida glyphosate, deve-se primeiramente reduzir a pressão de seleção e controlar os indivíduos com maior tolerância, antes que eles possam se multiplicar, contribuindo para elevação dos níveis de tolerância. Também preconiza-se outras medidas, como a rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, a realização de aplicações sequenciais, o emprego de associações de herbicidas com diferentes mecanismos de ação e de detoxificação (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003).

A evolução no nível de tolerância de uma determinada população de plantas daninhas está relacionado à variabilidade genética, pressão de seleção, número de genes envolvidos, fluxo gênico e da dispersão de propágulos. O devido conhecimento destes pontos é de suma importância, para que se possam fazer

previsões de proporções futuras entre plantas com maior tolerância e sensíveis em áreas infestadas e, dessa forma, escolher métodos de controle que impeçam a sua multiplicação e a disseminação.

6.4 CONCLUSÕES

Os marcadores RAPD foram satisfatórios em permitir a detecção de polimorfismo entre os biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate.

A similaridade genética entre biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate é baixa, evidenciando dessa forma grande variabilidade genética tanto intra quanto interpopulacional em ambas as espécies.

A grande variabilidade genética existente em populações de plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* juntamente com a grande pressão de seleção imposta pelo herbicida glyphosate, permitirá que os indivíduos com maior tolerância sobrevivam e produzam sementes, e assim ocupem os nichos disponíveis no ambiente, deixando pelas plantas sensíveis que serão controladas pelo herbicida.

7 INTERFERÊNCIA DE *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

Vários fatores determinam as perdas de rendimento de grãos devido à competição com plantas daninhas, dentre eles a espécie infestante. Entre as espécies daninhas de ocorrência comum em lavouras de soja das diferentes regiões do Brasil destacam-se as da família Rubiaceae, representadas principalmente por *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis*. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da interferência das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* sobre os componentes do rendimento e a produtividade das cultivares de soja V-TOP RR e BMX ATIVA RR. Dois estudos foram conduzidos em delineamento blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos foram resultantes de um bifatorial, em que o primeiro fator foi constituído pelas espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* e o segundo fator pelas densidades 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 plantas m⁻². Nas duas cultivares de soja foram avaliadas a altura de planta, área foliar e clorofila total nos estádios V₆ e R₅ da cultura, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e perda de rendimento de grãos. O rendimento de grãos de ambas as cultivares de soja foi negativamente afetado pela interferência com as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. A espécie *B. latifolia* foi mais competitiva com a cultura da soja do que *R. brasiliensis*, provocando maiores perdas em todas as variáveis analisadas. Para ambas as espécies rubiáceas, a redução do rendimento da soja decorrente da competição foi motivada pelo decréscimo no número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 1000 grãos.

Palavras-chave: Competição. *Glycine max*. Poaia-branca. Erva-quente. Densidade.

ABSTRACT

Several factors determine grain yield losses due to crop-weed competition, and the weed species is one of them. Two of the most common soybean fields weeds in Brazil are from the Rubiaceae family: *Borreria latifolia* and *Richardia brasiliensis*. The objective of the present study was to evaluate the effects of *B. latifolia* and *R. brasiliensis* on the yield and yield components of soybean cultivars V-TOP RR and BMX ATIVA RR. Two assays were conducted in a randomized complete block with four replicates, using a two-level factorial design, in which the first level consisted of the species *B. latifolia* and *R. brasiliensis* and the second factor the densities of 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 plants m⁻². The plant height, leaf area index and total chlorophyll in the V₆ and R₅ soybean stages, number of pods per plant, number of grains per pod, the mass of 1000 grains and grain yield loss were evaluated. The grain yield of the two soybean cultivars was negatively affected by the interference from *B. latifolia* and *R. brasiliensis* species. The species *B. latifolia* was more competitive with the soybean crop than *R. brasiliensis*, causing higher losses for all variables. For both

rubiaceous species, the reduction in the soybean yield due competition was caused by a decrement in the number of pods per plant, the number of grains per pod and weight of 1000 grains.

Keywords: Competition. *Glycine max*. White-eye. Broadleaf buttonweed. Density

7.1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos é um fato cada vez mais pertinente em debates sobre segurança alimentar. Segundo a FAO (2013), até o ano de 2050, a humanidade terá cerca de 9 bilhões de habitantes, o que aumentará a demanda por alimentos neste século XXI. Um dos grandes desafios do atual agronegócio é ampliar a produção agrícola capaz de atender a todas essas exigências e manter um bom nível de quantidade e qualidade na produção de alimentos para atender à crescente demanda.

A presença de plantas daninhas em áreas de lavoura tem sido apontada como um dos fatores mais importantes que contribuem para a redução da produtividade das culturas, evidenciando grande ameaça à produção sustentável de alimentos. Sua importância é tamanha, que cerca da metade dos agroquímicos comercializados no mundo, é representado pelos herbicidas (THEISEN; RUEDELL, 2004). Ao nível mundial, as perdas médias reais ocasionadas pela interferência das plantas daninhas atingem 4,3 a 15,2% do rendimento das culturas de algodão, arroz, batata, milho, soja e trigo (OERKE, 2006).

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) se tornou uma das mais importantes culturas na economia mundial (COSTA NETO e ROSSI, 2000). Dentre as espécies com destaque na interferência e diminuição do rendimento da soja destacam-se as espécies da família Rubiaceae. Na região Sudoeste do Paraná, as espécies rubiáceas mais comuns em áreas de soja são *Borreria latifolia* (erva-quente) e *Richardia brasiliensis* (poaia-branca).

A erva-quente é uma espécie herbácea, anual, com caule ereto ou prostrado com ramificações, desenvolvendo-se em todo o país, vegetando em áreas ocupadas por lavouras anuais e/ou perenes (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). A poaia-branca é uma espécie herbácea, anual e que se desenvolve em todo o país

de forma espontânea (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). Possui grande vigor vegetativo cobrindo completamente o solo a semelhança de um tapete, sendo considerada uma das principais infestantes das culturas de soja e milho das regiões Sul e Centro-Oeste, apresentando maior interferência no início do ciclo de culturas de verão (LORENZI, 2008).

A cultura da soja apresenta interações negativas com a presença de plantas daninhas, sendo essas, consideradas de grande importância durante o desenvolvimento da cultura. Dentre as interações negativas destacam-se a interferência das plantas daninhas sobre as plantas cultivadas em decorrência da competição por luz, nutrientes, água, entre outros (PITELLI; MARCHI, 1991). As perdas no cultivo da soja provocada pela interferência de plantas daninhas podem chegar a 80% em determinadas regiões, quando não manejada adequadamente (GAZZIERO et al., 2004).

A intensidade da interferência entre plantas daninhas e cultivadas pode ser determinada pela avaliação do decréscimo da produção da cultura quando em competição. Entre os vários fatores influenciando o decréscimo de produção, destacam-se a época e da duração da convivência, características associadas à espécie cultivada e características associadas à espécie daninha (PITELLI, 1985). Através da convivência de plantas daninhas com as culturas, pode-se determinar o nível de dano competitivo, nível crítico de dano e nível de dano econômico (PORTUGAL; VIDAL, 2010).

A presença de plantas daninhas, entre elas *Richardia brasiliensis* e *Spermacoce latifolia*, reduziu a formação dos trifólios e o acúmulo de massa seca ao longo do ciclo da soja, sendo maiores os danos conforme se aumentaram os níveis de infestação (PITTELKOW et al., 2009).

O período anterior à interferência das plantas daninhas foi avaliado por Benedetti et al. (2009), onde evidenciaram que a cultura da soja conviveu com a comunidade infestante, incluindo *Richardia brasiliensis*, até 25 dias após a semeadura, sem interferir significativamente na produtividade. Os mesmos autores verificaram ainda que a interferência com a soja durante 60 dias comparativamente a testemunha capinada, houve uma redução no potencial produtivo da cultura em 30%.

A incidência de erva-quente e poaia-branca nas lavouras de soja da região Sudoeste do Paraná vem aumentando substancialmente nos últimos anos. Evidencia-se, dessa forma, a necessidade de pesquisas para determinar a capacidade competitiva dessas espécies. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da interferência das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* sobre os componentes do rendimento e produtividade das cultivares de soja V-TOP RR e BMX ATIVA RR.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram desenvolvidos a campo, em solo classificado como Latossolo Vermelho distroférico, na área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, Paraná. O clima da região é classificado como subtropical úmido (Cfa). As condições climáticas durante a condução dos experimentos podem ser observadas na Figura 7.1. O experimento foi implantado em solo classificado como Latossolo Vermelho Distroférico (EMBRAPA, 2006), cujas características são apresentadas na Tabela 7.1.

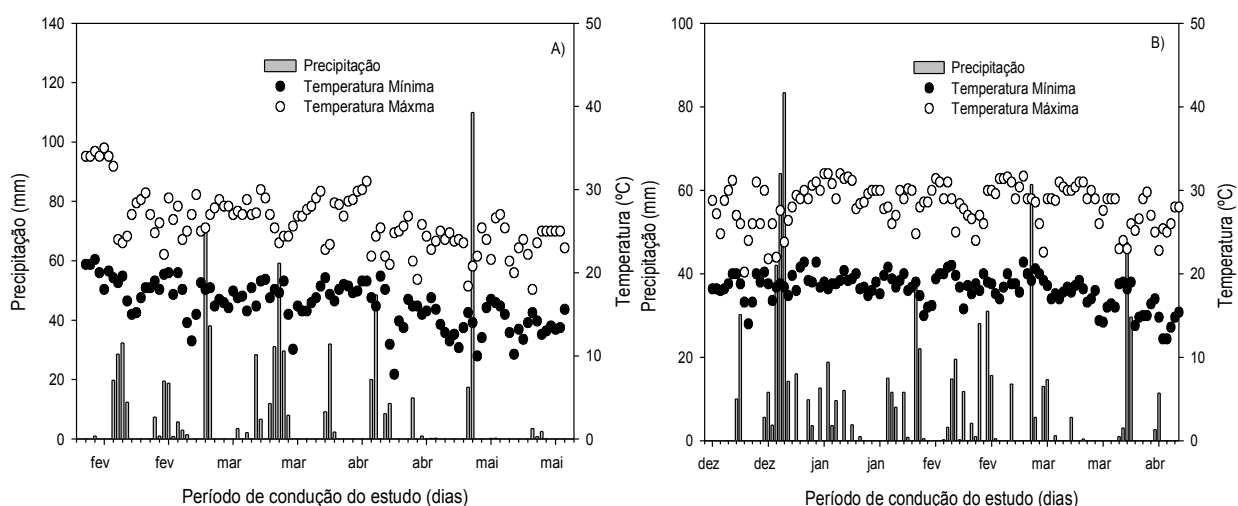


Figura 7.1 - Precipitação pluvial, temperatura mínima e máxima durante os períodos em que foram conduzidos os experimentos nas safras 2013/2014 (safrinha) (a) e 2014/2015 (safrina normal) (b). Fonte: IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tabela 7.1 - Distribuição granulométrica e atributos químicos de Latossolo Vermelho Distroférico. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Distribuição granulométrica		Atributos químicos	
Componente	%	Componente	Valor/Un. Medida
Argila	55,7	MO ^{*1}	49,50 g dm ⁻³
Areia	3	P ₂ O ₅ ^{*2}	14,32 mg dm ⁻³
Silte	41,3	K ₂ O ^{*3}	0,70 cmol _c dm ⁻³
		CTC ^{*4}	17,63
		pH ^{*5}	5,6
		H+Al ^{*6}	5,35 cmol _c dm ⁻³

^{*1}- Matéria orgânica; ^{*2}- Fósforo; ^{*3}- Potássio; ^{*4}- Capacidade de trocas catiônicas; ^{*5}- pH do solo; ^{*6}- Acidez trocável

Os experimentos seguiram procedimentos muito similares e por isso são descritos em conjunto. Os experimentos foram realizados na safra 2013/2014 (cultivar de soja V-TOP RR) e 2014/2015 (cultivar de soja BMX ATIVA RR), em delineamento experimental blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos foram resultantes de um fatorial 2 x 7, sendo o primeiro fator constituído pelas duas espécies daninhas (*Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis*) e o segundo fator constituído pelas densidades (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 plantas m⁻²).

Efetou-se a semeadura das cultivares de soja V-TOP RR (06/02/2014) e BMX ATIVA RR (15/12/2014) na densidade de 350 mil plantas ha⁻¹, em sistema de plantio direto, concomitantemente à semeadura das espécies de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. Ambas as cultivares de soja receberam tratamento de sementes com piraclostrobina+ tiofanato metílico+fipronil (200 mL p.c./100 kg de sementes). As sementes de ambas as espécies daninhas foram adquiridas da empresa Agrocósmos Agrícola (São Paulo, Brasil). As sementes de *B. latifolia* foram submetidas à superação de dormência através de calor seco a 60°C em estufa de secagem com circulação de ar durante 30 min e posteriormente imersão em nitrato de potássio (KNO₃) 2% por 3 horas. Já *R. brasiliensis* não necessita de superação de dormência. As sementes foram germinadas em caixas gerbox com dupla camada de papel de germinação umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes seu peso seco. Procedeu-se o transplante das plântulas na linha de semeadura da soja quatro dias após a semeadura da mesma, com o número de plantas correspondente a cada densidade. As parcelas possuíam quatro linhas de

semeadura, espaçadas entre si com 0,45 m e 1,5 m de comprimento (2,7 m²). Foi demarcada com estaca uma área de 1,0 m², onde foi efetuada a coleta das plantas para determinação dos componentes do rendimento e do rendimento de grãos.

Durante o desenvolvimento das plantas, foi efetuada a retirada manual das outras espécies daninhas presentes. Foram efetuadas quatro aplicações de fungicidas trifloxistrobina + proclorazoxolol (400 ml ha⁻¹) e azoxistrobina + ciproconazol (300 ml ha⁻¹) para controle de doenças foliares e uma aplicação dos inseticidas tiametoxan (180 ml ha⁻¹) e acefato (750 g ha⁻¹) para o controle de pragas.

Foram avaliadas a altura de planta, área foliar e clorofila total nos estádios V₆ e R₅ da cultura, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e perdas de rendimento de grãos de soja.

As variáveis analisadas altura de planta, área foliar, clorofila total nos estádios V₆ e R₅ foram determinadas em 10 plantas aleatórias na área útil das parcelas. A AF foi determinada com auxílio do integrador modelo LI-3100C. A clorofila total foi mensurada com o auxílio de um clorofilômetro da marca comercial ClorofiLOG® modelo CFL 1030, produzido pela Falker Automação Agrícola (FALKER, 2008).

Durante a maturação fisiológica, foram coletadas aleatoriamente 10 plantas na área útil das parcelas para a determinação da altura de planta, altura de inserção da primeira vagem e dos componentes de rendimento número de vagens por planta e número de grãos por vagem. O rendimento de grãos foi determinado pela coleta e trilha das plantas contidas em 1,0 m² de área útil das parcelas. A massa de mil grãos foi obtida pela contagem de 400 grãos obtidos na trilha da parcela para determinação do rendimento. A umidade de grãos foi corrigida ao valor de 13%. A produção obtida em cada parcela foi convertida para perda de rendimento em porcentagem em relação a testemunha sem a presença de plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*.

Os dados coletados foram submetidos à análise da variância pelo teste F (p<0,05) com o auxílio do programa Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005). A relação entre níveis de fator quantitativo e variáveis resposta foi ajustada por regressão não linear com o auxílio do programa Sigmaplot 10.0.

Calcularam-se as porcentagens de perda de rendimento de grãos e sua relação com a densidade de plantas de *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* foi ajustada pelo modelo da hipérbole retangular, proposto por Cousens (1985):

$$Pr = (i*d)/(1 + ((i/A)*d)) \text{ ou } Pr = (A d)/(D_{50}+d)$$

Em que: Pr = perda de rendimento (%); d = densidade de plantas; i = porcentagem de perda de rendimento por unidade de planta daninha quando sua densidade se aproxima de zero; A = porcentagem de perda de rendimento quando a densidade de plantas daninhas tende ao infinito. A razão A/i indica a densidade de plantas onde a queda do rendimento é a metade da verificada na assíntota (D_{50}). Os cálculos foram efetuados com auxílio do programa Sigmaplot 10.0.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância demonstrou significância do fator densidade para as variáveis resposta número de grãos por vagem para a cultivar V-TOP RR e clorofila total para a cultivar BMX ATIVA RR. Para as demais variáveis resposta houve significância para a interação bi-fatorial espécie x densidade. Os modelos logístico de 3 e 4 parâmetros apresentaram bom ajuste entre as densidades de *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* e as variáveis resposta. Os coeficientes de determinação variaram de 0,85 a 0,99 (Tabelas 7.2 e 7.4).

Tabela 7.2 - Parâmetros das equações e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis em resposta a interferência com as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* na cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Estádio	Variável	Espécie	Parâmetros				
			a	b	x0	y0	R ²
V6	Altura	<i>B. latifolia</i>	58,65	0,34	2449,32	-	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ^{n.s.}	-	-	-	-	-
	Clorofila total	<i>B. latifolia</i> ¹	45,49	0,29	23,91	-	0,92
		<i>R. brasiliensis</i> ^{n.s.}	-	-	-	-	-
	Área foliar	<i>B. latifolia</i> ¹	429,72	0,92	44,19	-	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	426,24	0,70	504,38	-	0,99
R5	Altura	<i>B. latifolia</i> ¹	76,97	0,82	111,80	-	0,97
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	75,21	0,73	349,85	-	0,99
Maturação fisiológica	Massa seca	<i>B. latifolia</i> ¹	653,55	0,69	124,53	-	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	654,11	1,20	85,23	-	0,96
	Altura	<i>B. latifolia</i> ¹	86,95	0,79	143,71	-	0,92
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	84,51	0,64	773,01	-	0,95
	Nº de vg/pl	<i>B. latifolia</i> ¹	24,24	1,02	18,13	-	0,94
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	24,02	1,03	32,19	-	0,91
	Nº gr/vg	<i>B. latifolia</i> ¹	2,47	3,04	13,76	-	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	2,54	2,69	17,79	-	0,97
	Alt. Ins. 1ª vg	<i>B. latifolia</i> ¹	3,36	1,84	7,91	-	0,99
		<i>R. brasiliensis</i> ²	-1,26	-1,45	6,73	12,40	0,98
	Massa mil gr	<i>B. latifolia</i> ¹	149,43	0,82	29,42	-	0,99
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	148,82	1,01	30,13	-	0,99

¹ Logística de 3 parâmetros. ² Logística de 4 parâmetros. ^{n.s.}=não significativo. a= média da resposta da testemunha; b= declividade da curva; x0 (D_{50})= (densidade que representa a redução de 50% da variável analisada); y0=média da resposta sob densidades elevadas.

7.3.1 Cultivar V-TOP RR

As variáveis altura e clorofila total de plantas de soja no estágio V₆ não foram afetadas pela variação na densidade de plantas de *Richardia brasiliensis* (Fig 7.2 A e C). Efeito diferente ocorreu com a espécie *B. latifolia*, cujo incremento na densidade resultou em redução na altura de planta e clorofila total da soja, que atingiu valores máximos de 13,1 e 10,8%, respectivamente. A altura das plantas de soja em R₅ (Fig. 7.2 B) foi reduzida com o incremento da infestação de ambas espécies daninhas, com poucas diferenças de impacto entre elas. Porém, assim como no estágio V₆, a redução da altura da planta cultivada foi de baixa magnitude.

O incremento na densidade das duas espécies daninhas provocou redução da área foliar de plantas de soja em V₆, porém a magnitude do efeito foi maior em *B. latifolia* do que em *R. brasiliensis* (Figura 7.2 D). Na densidade máxima

utilizada, a redução de área foliar provocada pela primeira espécie foi de 21,7% contra 6,7% provocada pela segunda.

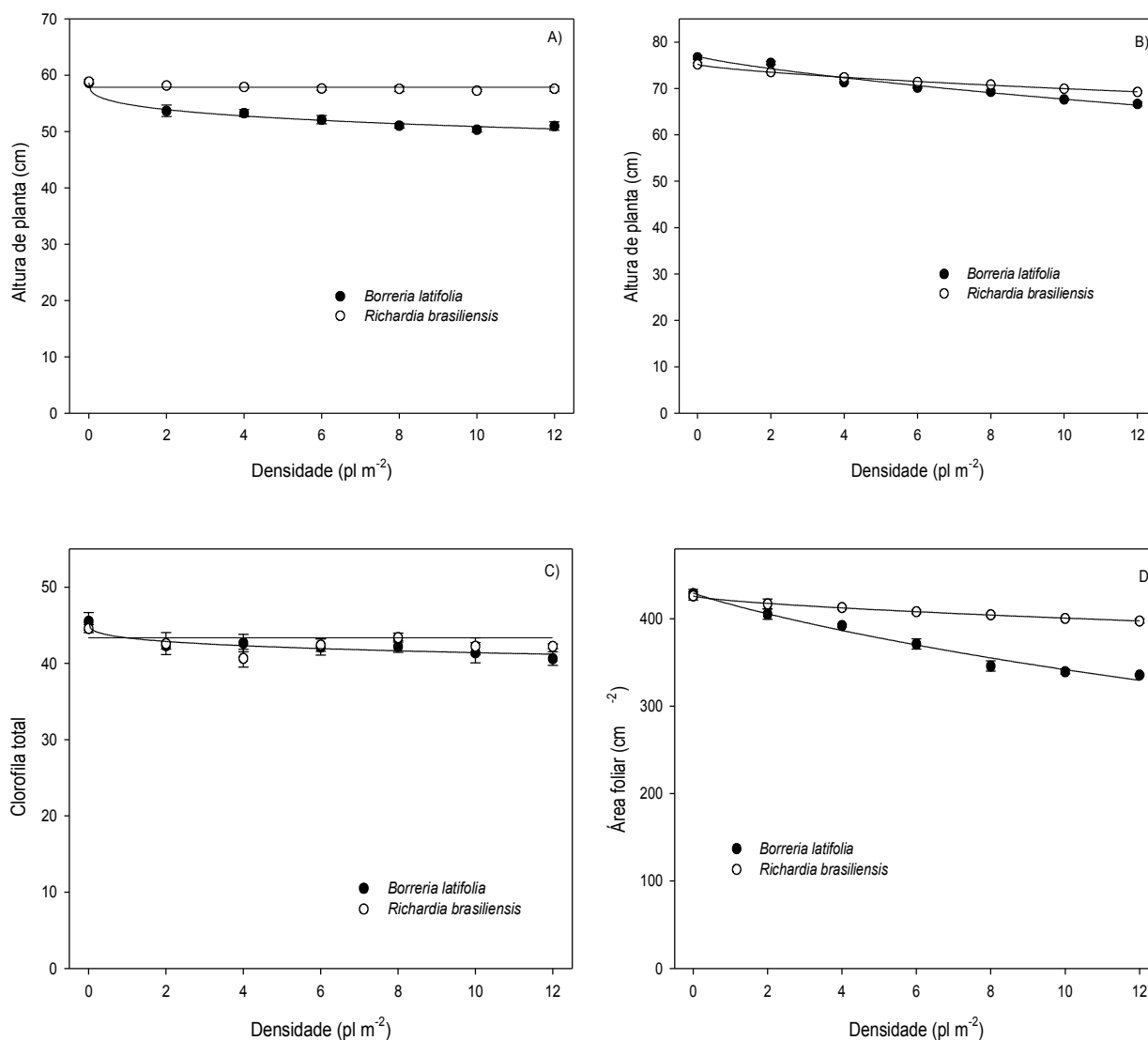


Figura 7.2 – Altura de planta em estágio fisiológico V₆ (A) e R₅ (B) e clorofila total (C) e área foliar (D) no estágio V₆ da cultivar de soja V-TOP RR, em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A altura de planta e a massa seca em maturação fisiológica decresceram em resposta ao aumento nas densidades de plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, entretanto, *B. latifolia* apresentou-se mais competitiva provocando maior redução (Fig. 7.3 A e B). O incremento na densidade das espécies daninhas resultou em aumento da altura de inserção de primeira vagem da soja (Fig. 7.4 B). Para esta variável, não houve diferenças de efeito produzido entre as espécies até a

densidade de 4 pl m⁻², a partir da qual houve incremento mais expressivo nos tratamentos com interferência de *B. latifolia*. O incremento da altura em relação à testemunha atingiu o valor máximo de 27% (Fig. 7.4 B).

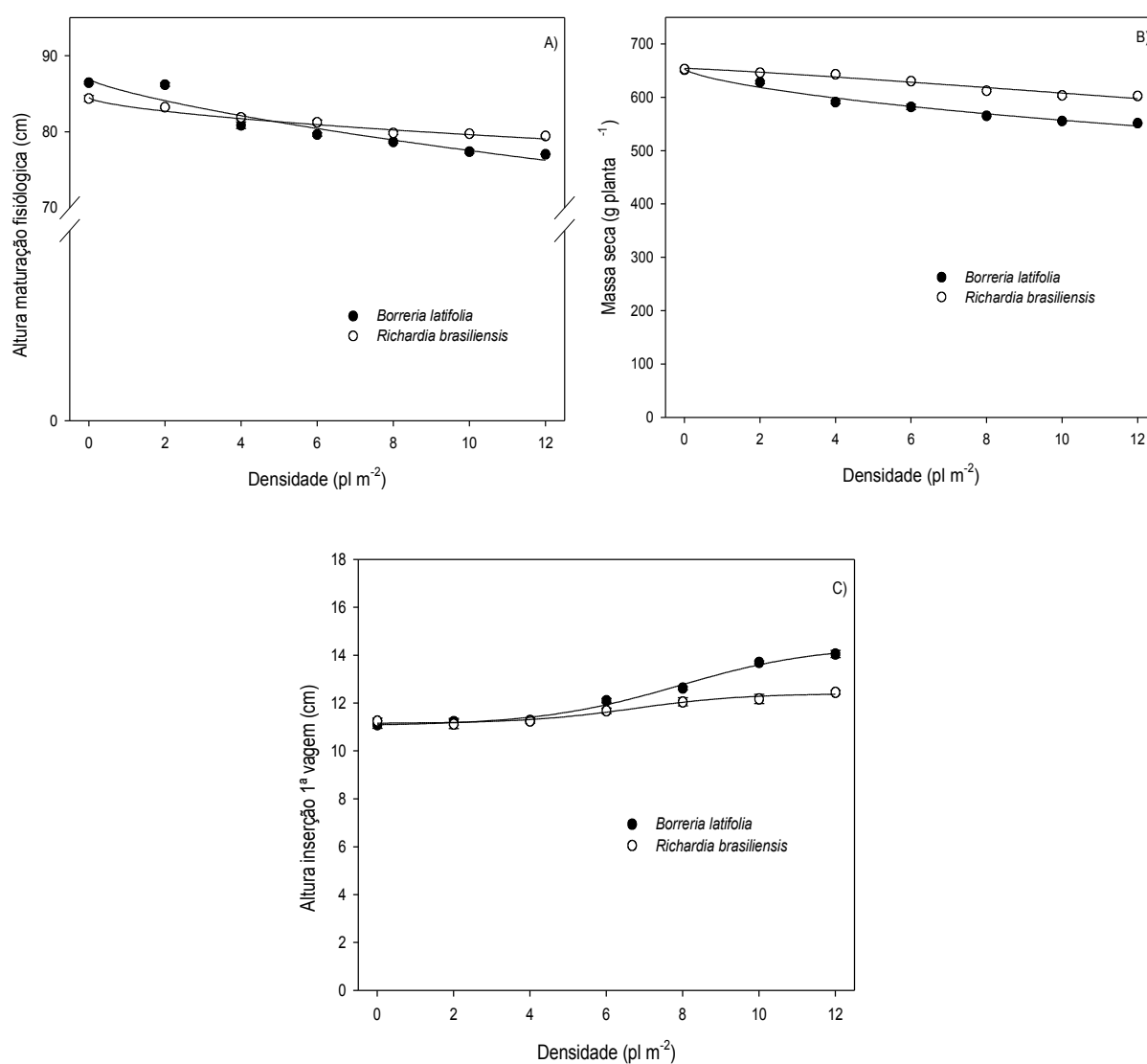


Figura 7.3 – Altura de planta em maturação fisiológica (A), massa da parte aérea seca (B) e altura da inserção da primeira vagem (C) na maturação fisiológica da cultivar de soja V-TOP RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Assim como para as variáveis biométricas, a espécie *B. latifolia* provocou maior impacto sobre os componentes do rendimento das plantas da soja do que a espécie *R. brasiliensis*. Ambas as espécies rubiáceas produziram perdas significativas do número de vagem de soja por planta, número de grãos por vagem e

massa de 1000 grãos (Fig. 7.4 A, B e C), porém as maiores perdas foram causadas por *B. latifolia*, totalizando 35, 41 e 31% de perda máxima, respectivamente, contra 22, 25 e 26% de *R. brasiliensis*.

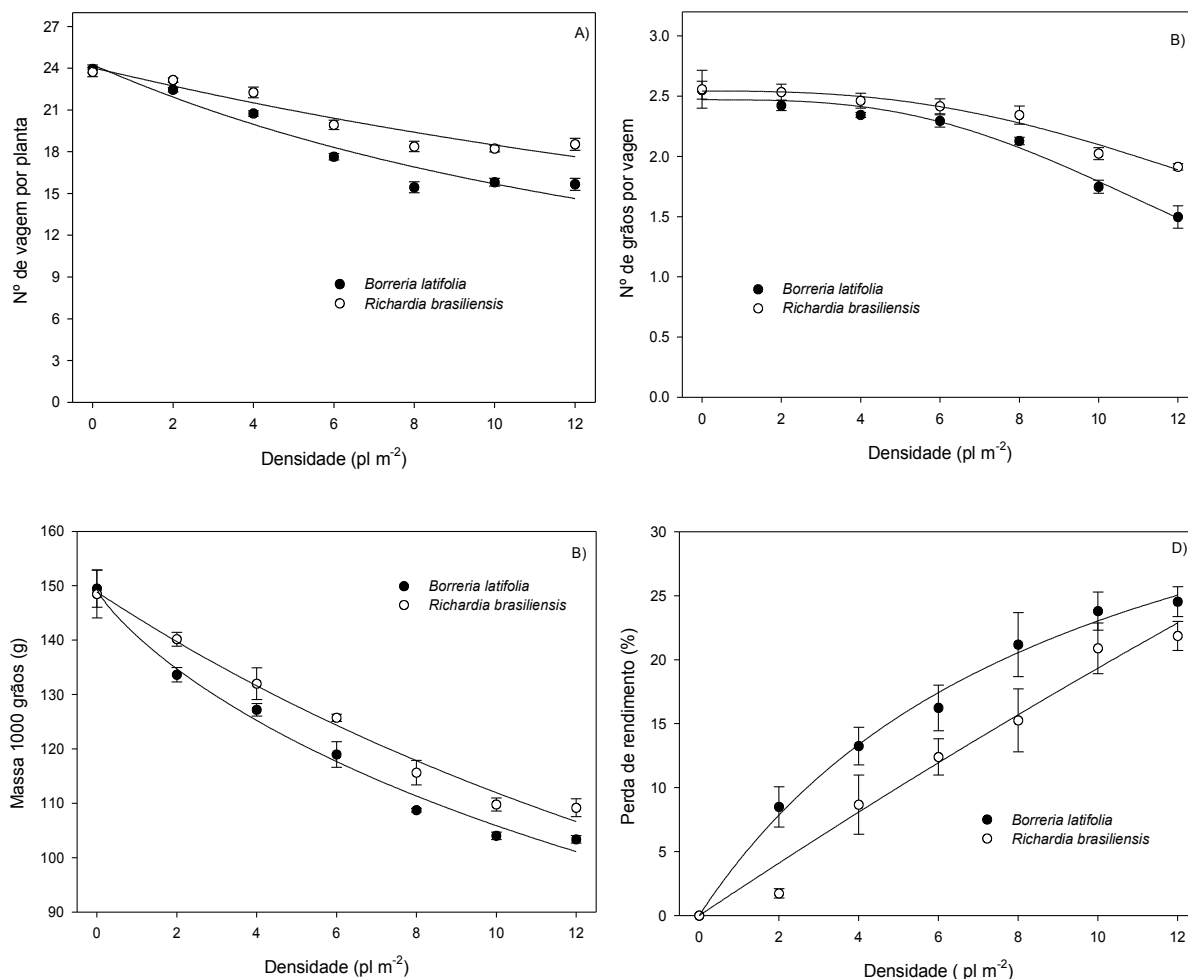


Figura 7.4 – Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), massa de 1000 grãos (C) e perda de rendimento (D) da cultivar de soja V-TOP RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Incremento significativo nas perdas de rendimento foi constatado à medida em que aumentaram-se as densidades de plantas das duas espécies daninhas. A máxima densidade de plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, de 12 pl m⁻², resultou em redução de 24 e 19% no rendimento da soja, respectivamente (Fig. 7.4 D).

Tabela 7.3 - Parâmetros das equações para determinar a relação entre as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* e a perda percentual do rendimento da cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Variável	Espécie	Parâmetros*			
		a	D ₅₀	i	R ²
Perda de Rendimento (%)	<i>B. latifolia</i>	44,49	9,31	4,78	0,99
	<i>R. brasiliensis</i>	266,14	127,60	2,09	0,98

*Equação hiperbólica $y = (a * d)/(D_{50} + d)$ com base nos dados normalizados para percentagem de perda em relação a testemunha não infestada, onde a = assíntota máxima; d = densidade de infestante (variável independente); D_{50} = densidade onde ocorre 50% da perda do rendimento; $i = a/D_{50}$ = nível crítico de dano.

Para a redução de 50% do rendimento de grãos da cultivar de soja V-TOP RR foram necessárias 9 plantas de *B. latifolia*, enquanto para a redução de rendimento na mesma proporção foram necessárias 127 plantas de *R. brasiliensis* (Tab. 7.3). Os níveis críticos de dano (parâmetros i) (Vidal and Portugal, 2010) estimados pela equação da hipérbole retangular, foram de 4,8 e 2,1 (Tab. 7.3), ou seja, cada planta de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* por m² foi capaz de reduzir em aproximadamente 5 e 2% a produtividade da soja, respectivamente.

7.3.2 Cultivar BMX ATIVA RR

As variáveis altura de planta, clorofila total e área foliar (Fig. 7.5 A, B e C) no estágio V₆ da cultivar BMX ATIVA RR foram afetadas negativamente pela variação na densidade de plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. Para a altura de planta (Fig. 7.5 A), houve diferença significativa entre as duas espécies estudadas, a partir da densidade de 6 pl m⁻², atingindo redução máxima de 15 e 10% para *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, respectivamente.

Foi constatada redução significativa para as variáveis clorofila total e área foliar da soja cultivar BMX ATIVA RR em resposta a interferência das duas espécies daninhas (Fig. 7.5 B e C). A espécie *B. latifolia* apresentou maior redução no teor de clorofila total das folhas de soja, porém diferenças entre as espécies foram de baixa magnitude e somente foram constatadas a partir da densidade de 8 pl m⁻² (Fig. 7.5 B). Para a variável área foliar (Fig. 7.5 C) evidenciou-se perdas a partir da densidade 4 pl m⁻², sendo que a maior redução foi atingida por *B. latifolia* totalizando 4%, enquanto para *R. brasiliensis* a redução foi de 2% para a maior

densidade empregada.

Tabela 7.4 - Parâmetros das equações e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis em resposta a interferência com as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* na cultivar de soja BMX Ativa RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Estádio	Variável	Espécie	a	b	x0	y0	R ²
V ₆	Altura	<i>B. latifolia</i> ¹	58,74	1,05	60,41	-	0,97
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	58,28	1,11	77,66	-	0,97
	Clorofila total	<i>B. latifolia</i> ¹	32,33	0,76	130,11	-	0,91
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	32,21	0,64	281,57	-	0,85
	Área foliar	<i>B. latifolia</i> ¹	937,72	1,36	134,43	-	0,99
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	937,67	1,43	206,48	-	0,97
R ₅	Altura	<i>B. latifolia</i> ¹	74,69	1,94	24,05	-	0,99
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	73,99	2,35	37,79	-	0,97
	Clorofila total	<i>B. latifolia</i> ¹	46,99	1,07	50,98	-	0,97
		<i>R. brasiliensis</i> ^{n.s.}	-	-	-	-	-
	Área foliar	<i>B. latifolia</i> ¹	2091,09	1,79	20,26	-	0,94
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	2028,94	1,43	53,51	-	0,99
Maturação fisiológica	Massa seca	<i>B. latifolia</i> ¹	540,56	0,99	66,67	-	0,99
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	548,42	1,63	57,83	-	0,99
	Altura	<i>B. latifolia</i> ¹	81,88	0,89	72,48	-	0,95
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	82,48	2,39	36,84	-	0,98
	Nº de vg/pl	<i>B. latifolia</i> ¹	34,58	1,09	26,44	-	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	34,65	0,95	89,59	-	0,95
	Nº gr/vg	<i>B. latifolia</i> ¹	2,85	1,29	15,41	-	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	2,67	0,75	52,44	-	0,99
	Alt. Ins. 1ª vg	<i>B. latifolia</i> ²	3,60	4,79	7,68	10,98	0,98
		<i>R. brasiliensis</i> ²	-0,65	-1,52	7,78	12,21	0,99
	Massa mil gr	<i>B. latifolia</i> ¹	240,84	0,73	83,93	-	0,95
		<i>R. brasiliensis</i> ¹	239,41	0,90	94,20	-	0,96

¹Logística de 3 parâmetros. ²Logística de 4 parâmetros. n.s.=não significativo. a= média da resposta da testemunha; b= declividade da curva; x0 (D_{50})= (densidade que representa a redução de 50% da variável analisada); y0=média da resposta sob densidades elevadas.

A redução na altura de planta de soja no estágio R₅ em função do incremento da densidade de plantas das duas espécies rubiáceas se ajustou ao modelo logístico de três parâmetros (Fig. 7.6 A). A interferência com *B. latifolia* provocou reduções mais expressivas da altura neste estágio do que em V₆, atingindo 20% com a máxima densidade avaliada, enquanto para a espécie *R. brasiliensis* a redução foi de 7%.

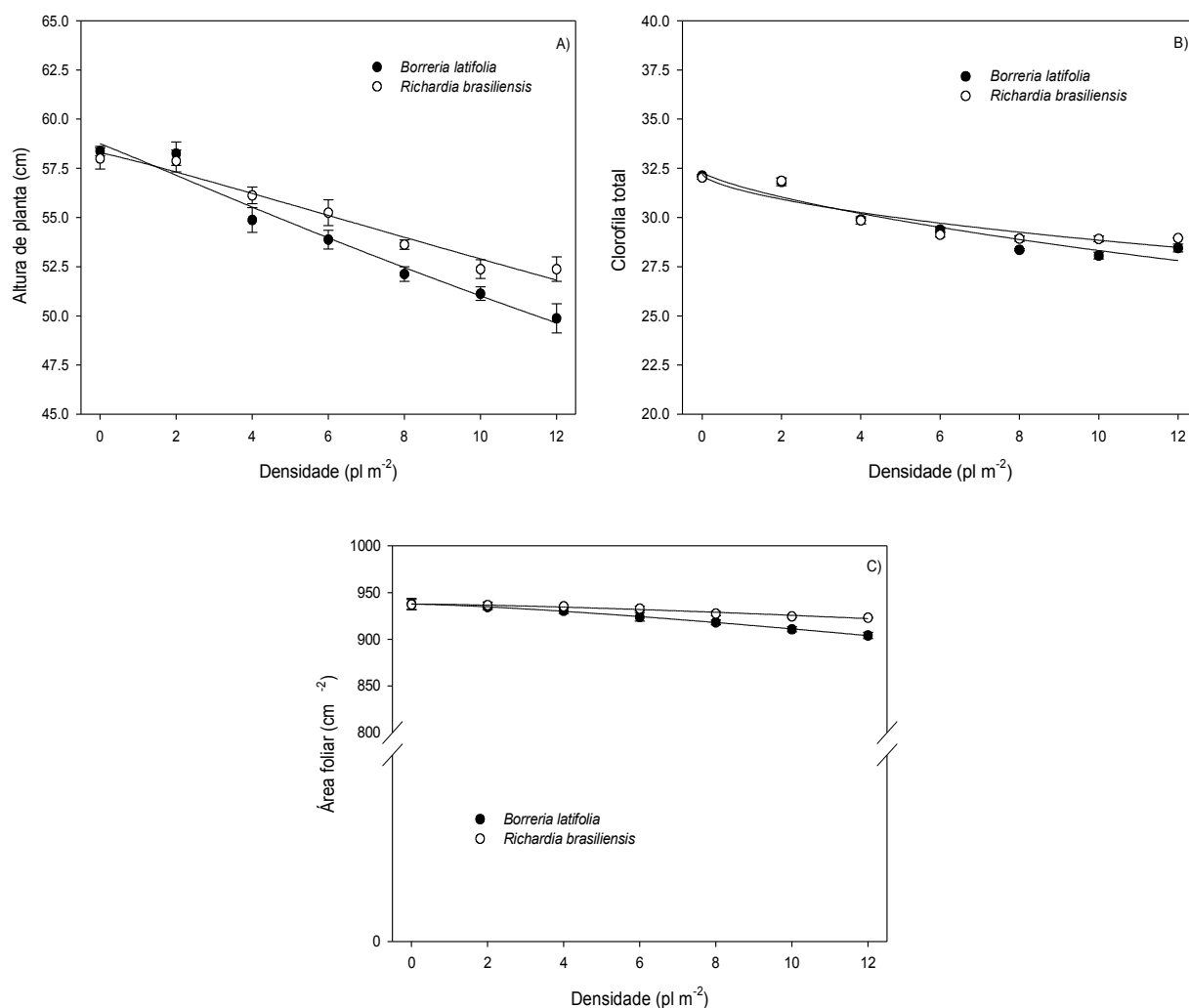


Figura 7.5 – Altura de planta (A), clorofila total (B) e área foliar (C) em estágio fisiológico V₆ da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Os efeitos sobre o teor de clorofila total no estágio R₅ foram contrastantes com os observados no estágio de desenvolvimento V₆ (Fig. 7.6 B). Em R₅, o incremento populacional das plantas de *R. brasiliensis* não produziu variação nos teores de clorofila total das folhas de soja, porém o teor de clorofila total respondeu de forma inversa à densidade de plantas de *B. latifolia*. Ambas as espécies rubiáceas provocaram perdas expressivas nas variáveis área foliar em estágio R₅. Houve redução na área foliar da soja a partir da densidade de 8 pl m⁻² (Fig. 7.6 C) totalizando perdas de 27 e 11% para *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, respectivamente.

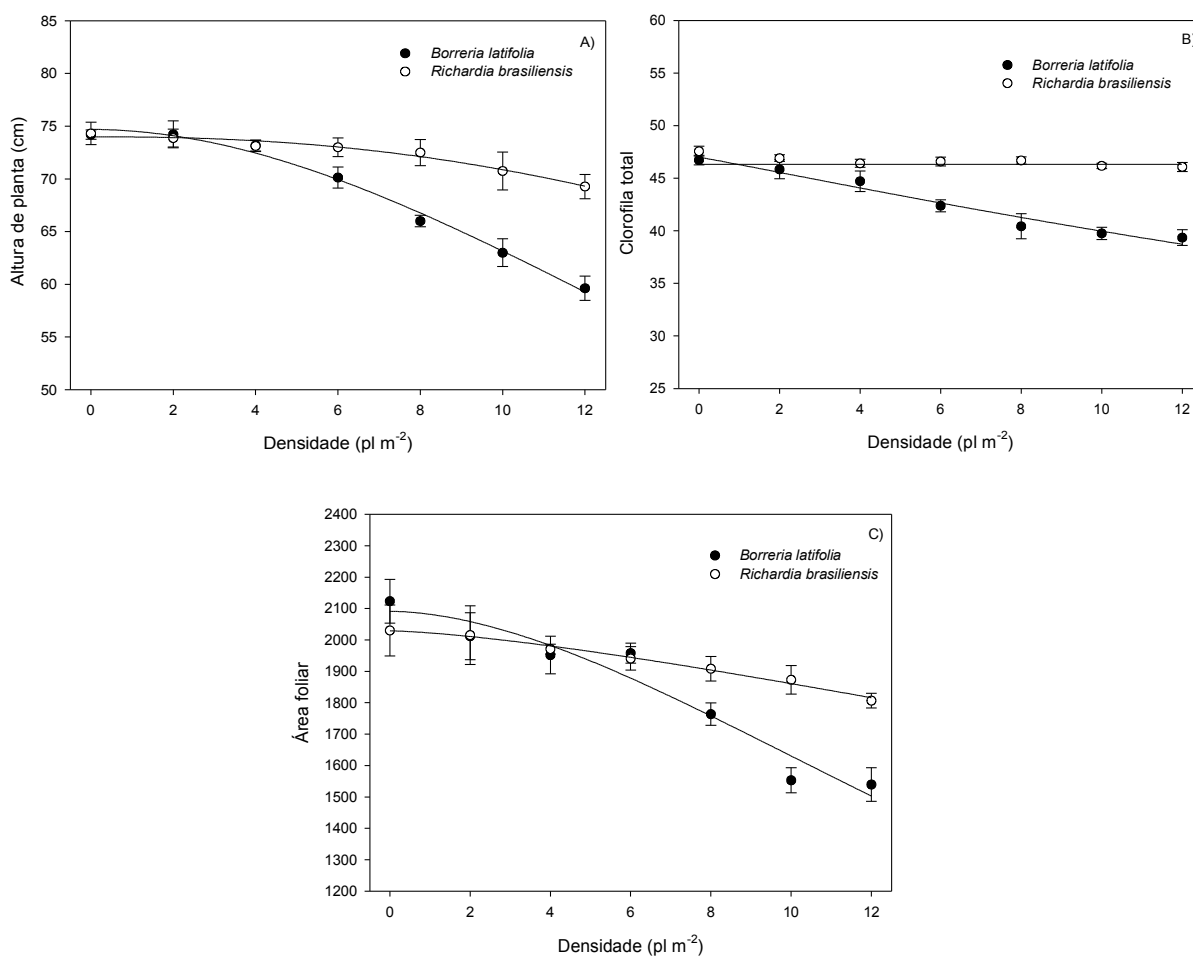


Figura 7.6 – Altura de planta (A), clorofila total (B) e área foliar (C) em estágio fisiológico R₅ da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A variável altura de plantas em maturação fisiológica foi influenciada pela presença das duas rubiáceas durante o ciclo. A espécie *B. latifolia* provocou maiores reduções na altura de planta, comparativamente a *R. brasiliensis*, atingindo redução de 15 e 6% para a maior densidade, respectivamente (Fig. 7.7 A). Para a massa seca de plantas (Fig. 7.7 D), evidenciou-se perdas a partir da menor densidade testada (2 pl m⁻²). *B. latifolia* apresentou-se mais competitiva e assim proporcionou maiores perdas nessa variável em todas as densidades estudadas. As alturas de inserção de primeira vagem (Fig. 7.7 B) sofreram incremento com o aumento da densidade das espécies infestantes, porém sem diferenças entre *B. latifolia* e *R. brasiliensis* até a densidade de 4 pl m⁻². A partir desta densidade, a interferência com *B. latifolia* resultou aumento na altura de inserção da primeira

vagem muito mais expressivo, totalizando 17% comparado com a testemunha sem infestação, enquanto *R. brasiliensis* apresentou incremento de apenas 5%.

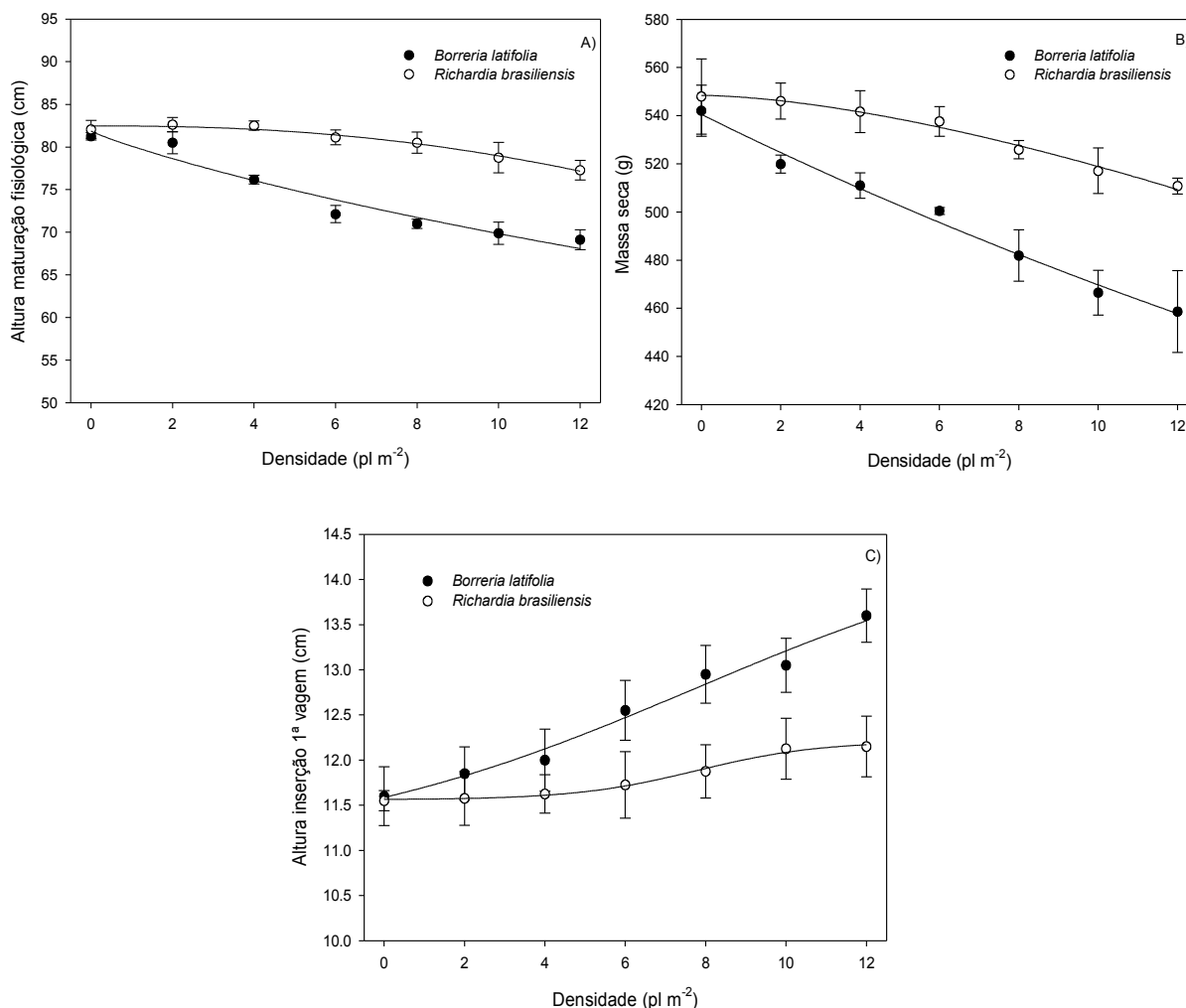


Figura 7.7 – Altura de planta em maturação fisiológica (A), massa da parte aérea seca (B) e altura de inserção primeira vagem (C) na maturação fisiológica da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

As variáveis número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e o rendimento da cultura da soja (Fig. 7.8 A, B, C e D) foram afetados negativamente pela interferência das duas espécies rubiáceas, entretanto, os danos causados pela interferência com *B. latifolia* foram maiores.

O número de vagens por planta diferiu entre as duas espécies apenas a partir da densidade de 4 pl m⁻², totalizando 11 e 7% para as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, respectivamente (Fig. 7.8 A). O aumento das densidades de plantas

daninhas interferindo com a cultura incrementou as perdas no número de vagens, evidenciando redução máxima de 27 e 12% para *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, respectivamente. O número de grãos por vagem foi influenciado a partir da densidade de 6 pl m⁻², atingindo 26 e 16% de redução para *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, respectivamente (Fig. 7.8 B). Evidenciou-se que *B. latifolia* também foi responsável pelas maiores reduções na massa de 1000 grãos, atingindo perda máxima de 17%, enquanto a espécie *R. brasiliensis* apresentou perda máxima de 12% (Fig. 7.8 C).

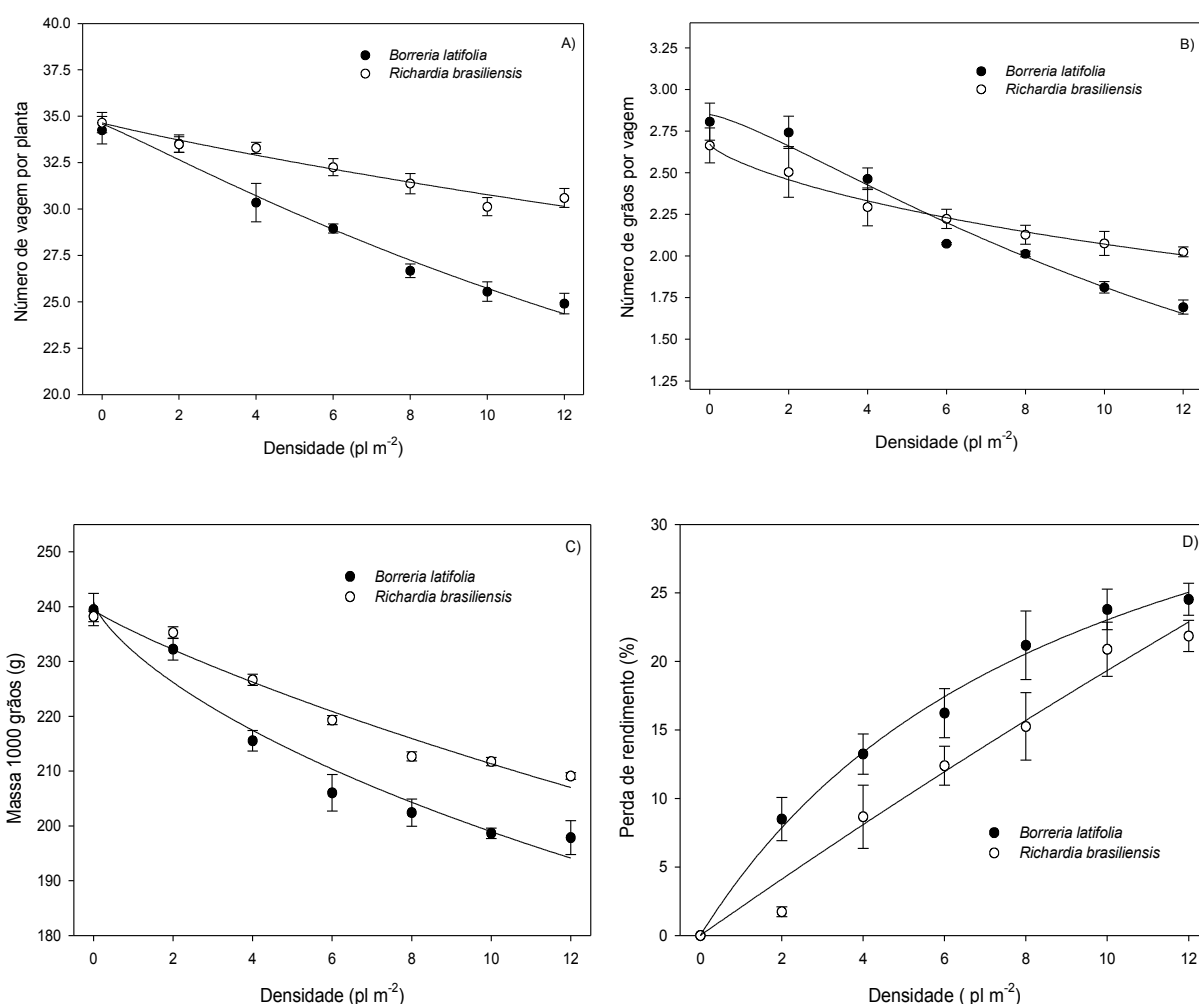


Figura 7.8 – Número de vagem por planta (A), número de grãos por vagem (B) massa de mil grãos (C) e perda de rendimento (D) da cultivar de soja BMX Ativa RR em resposta a interferência de diferentes densidades das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O aumento das densidades de plantas das duas espécies rubiáceas determinou incremento na perda de rendimento. A espécie *B. latifolia* apresentou-se

mais competitiva com cultivar de soja BMX ATIVA RR, atingindo o máximo de perda de rendimento de grãos de 39%, enquanto a espécie *R. brasiliensis* apresentou perda máxima de 30%, na maior infestação (Fig. 7.8 D).

A partir do modelo da hipérbole retangular foram estimados valores de 11 e 2115 plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* por m² para atingir redução de 50% do rendimento de grãos da cultivar de soja BMX ATIVA RR. O nível crítico de dano ou parâmetro *i* (VIDAL; PORTUGAL, 2010) do modelo tipo hipérbole retangular evidenciou que cada planta por m² de *B. latifolia* foi responsável pela perda de 6% do rendimento de grãos, valor maior à perda percentual de rendimento de grãos ocasionada por *R. brasiliensis*, que foi de 2% (Tab. 7.5).

Tabela 7.5 - Parâmetros das equações para determinar a relação entre as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* e a perda percentual do rendimento da cultivar de soja BMX Ativa RR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Variável	Espécie	Parâmetros*			
		a	D ₅₀	i	R ²
Perda de Rendimento (%)	<i>B. latifolia</i>	71,87	11,44	6,28	0,97
	<i>R. brasiliensis</i>	5439,05	2115,05	2,57	0,98

*Equação hiperbólica $y = (a * d)/(D_{50} + d)$ com base nos dados normalizados para percentagem de perda em relação a testemunha não infestada, onde *a* = assíntota máxima; *d* = densidade de infestante (variável independente); *D*₅₀ = densidade onde ocorre 50% da perda do rendimento; *i* = *a*/*D*₅₀ = nível crítico de dano.

7.3.3 Discussão

As duas safras apresentaram condições de precipitação, temperaturas máximas e mínimas favoráveis ao crescimento e desenvolvimento da cultura e também das plantas infestantes (Fig. 7.1).

Dentre os fatores avaliados, o impacto gerado pela densidade de espécies rubiáceas sobre as variáveis respostas da cultura da soja foi superior. Os resultados demonstram que o incremento populacional das espécies rubiáceas resultou em efeito negativo sobre todas as variáveis resposta avaliadas para as duas cultivares de soja empregadas nos estudos, com exceção da variável altura de inserção da primeira vagem, que apresentou incremento com a elevação das densidades de *B. latifolia* e *R. brasiliensis*.

Com o aumento da densidade da espécie infestante, é incrementada a

disputa por recursos essenciais ao desenvolvimento da espécie cultivada. Dentre os recursos essenciais sendo disputados estão radiação solar, água e nutrientes, além de CO₂ (PITELLI; MARCHI, 1991). O desenvolvimento morfológico das plantas é dependente de intensidade e qualidade espectral da radiação, que sendo adequado assegura maior eficiência do maquinário fotossintético na captação e na utilização da energia radiante (MARTINS et al., 2009). A radiação solar é um dos fatores fundamentais para que ocorra o processo de fotossíntese, ou seja, só através da radiação solar pode ocorrer a conversão da energia luminosa para a química (VIEIRA et al., 2010). Dessa forma, o sombreamento das plantas de soja, determinado pela presença de plantas rubiáceas infestantes, reduziu a radiação no espectro da luz visível (400 e 700 nm), diminuindo a energia disponível para a fotossíntese. Embora a espécie *B. latifolia* possa apresentar tanto caule ereto quanto prostrado (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010), no presente experimento foi possível perceber que *B. latifolia* apresentou comportamento ereto e maior altura do que as plantas de *R. brasiliensis*, atingindo desenvolvimento igual ou superior à cultura da soja, resultando em maior interferência com a cultura. Muitos estudos relatam plasticidade diferencial entre espécies cultivadas e plantas daninhas em resposta à interferência interespecífica (SATTIN ET AL., 1994; GIBSON ET AL., 2004; FLECK ET AL., 2008). O aumento da altura favorece a competição por luz, estudo realizado por Stoller & Woolley (1985) com a espécie *Abutilon theophrasti* e *Datura stramonium* competindo com soja, foi possível observar que as plantas infestantes cresceram mais alto que a cultura da soja e interceptaram 44 e 56% da radiação solar, diminuindo o rendimento de grãos da soja em 19 e 25%, respectivamente.

Além disso, resultante do sombreamento das plantas de soja, os teores de clorofila total nas folhas apresentaram decréscimo acentuado para a espécie *B. latifolia*, como fora anteriormente observado por Victório, Kuster e Lange (2007). As clorofilas, assim como os carotenóides, são pigmentos presentes nos vegetais capazes de captar a radiação visível, desencadeando as reações fotoquímicas da fotossíntese (SEIFERMAN-HARMS, 1987). O tipo, quantidade e incorporação de clorofila e carotenóides dentro do aparato fotossintético dependem da qualidade e quantidade de luz (MACMAHON et al., 1991).

A presença de plantas vizinhas, como no caso das infestações de rubiáceas, provoca redução da razão entre radiação vermelho:vermelho extremo (600 a 720 nm) (V:Ve), em comparação à áreas onde há somente plantas cultivadas (VIDAL; MEROTTO Jr., 2010). A baixa razão entre V:Ve afeta a distribuição de fotossintatos, com o favorecimento do crescimento da folhagem em detrimento das raízes, fenômeno conhecido como “shade avoidance syndrome (SAS)” ou “síndrome de escape do sombreamento” (VIDAL; MEROTTO Jr., 2009). Esse fenômeno, provavelmente contribuiu para a elevação da altura da primeira vagem das plantas de soja, com maior intensidade na interferência com plantas de *B. latifolia* do que com *R. brasiliensis*. Isso pode indicar que características morfológicas e fisiológicas das plantas de *B. latifolia* podem proporcionar menor razão V/Ve do que plantas de *R. brasiliensis* e, conseqüentemente, maior SAS.

A redução de características biométricas e da biomassa das plantas de soja pode ser explicada tanto em função da quantidade quanto da qualidade da radiação incidente. Isso é explicado porque na cultura da soja o incremento da radiação Ve também pode resultar em diminuição da massa da parte aérea seca das plantas de soja já aos 16 dias após a emergência (LA ROSA et al., 1999). Outros órgãos e partes das plantas, como a área foliar (PYKE; LOPEZ-JUEZ, 1999) e comprimento entrenós (PAUSCH et al., 1991) também podem ser modificados pela qualidade da luz.

Evidenciou-se no presente estudo, que *B. latifolia* foi muito mais competitiva com a cultura da soja, comparativamente à espécie *R. brasiliensis*. Cada planta de *B. latifolia* que emergiu juntamente com a cultura da soja foi responsável por 5 e 6% de redução no rendimento para as cultivares de soja V-TOP RR e BMX ATIVA RR, respectivamente. Essas perdas podem ser consideradas elevadas comparativamente a outras espécies daninhas. Como exemplo, estudo com plantas infestantes das espécies *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia* reduziram a produtividade da soja em 1,58 e 0,69%, respectivamente (RIZZARDI et al., 2010). Em outro estudo, plantas de *Conyza bonariensis* implantadas no mesmo dia da semeadura da soja resultaram em perda de apenas 0,97% do rendimento (TREZZI et al., 2015).

Essa perda expressiva de rendimento de grãos em função da interferência com as espécies daninhas rubiáceas pode estar relacionada à grande

redução na área foliar das plantas de soja, que resulta em redução da captação de radiação solar, com reflexos negativos sobre a fotossíntese. Além disso, a redução da biomassa da parte aérea das plantas com a interferência é um indicativo da redução do peso de folhas e do número de ramificações em plantas dicotiledôneas, variáveis que influenciam diretamente o número de flores e vagens produzidos pelas plantas (SCHMITT; WULFF, 1993; SILVA et al., 2009), corroborando com os resultados do presente estudo.

Diante das elevadas perdas potenciais de dano das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, em cultivares modernas de soja, os resultados do presente estudo indicam grande importância do manejo adequado dessas infestantes. Para aplicações em plântulas de *B. latifolia* com 1-3 e 4-6 folhas, a dose de 960 g i.a. ha⁻¹ de glyphosate resultou em 81 e 100% de controle, respectivamente (RAMIRES et al., 2011), demonstrando a importância do manejo de infestantes nos estádios iniciais de desenvolvimento.

Práticas de manejo que objetivem a redução da emergência destas espécies daninhas rubiáceas podem ser benéficas, pois impediriam a interferência precoce com a planta cultivada. Neste contexto, as misturas em tanque de herbicida residuais com glyphosate ou aplicações sequenciais com herbicidas de outros mecanismos de ação representam uma importante estratégia para o controle dessas espécies. A rotação de culturas é uma ferramenta valiosíssima para reduzir infestações e melhorar a eficiência de controle das espécies daninhas em áreas agricultáveis, pois possibilita a cobertura de solo durante grande parte do tempo, além da rotação dos mecanismos de ação herbicida.

7.4 CONCLUSÕES

A espécie *B. latifolia* apresentou-se mais competitiva com a cultura da soja, provocando maiores perdas em todas as variáveis analisadas comparado à *R. brasiliensis*.

O rendimento de grãos de soja foi negativamente afetado pela interferência com as espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*.

Para ambas as espécies rubiáceas, a redução do rendimento foi

motivada pelo decréscimo no número de vagens por planta, número de grãos por vagem e peso de 1000 grãos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o passar do tempo, as populações de plantas daninhas foram se tornando cada vez mais densas, diversificadas e especializadas na ocupação dos agroecossistemas, passando a intervir profundamente nas atividades agrícolas. Durante o processo evolutivo, as plantas adquiriram ampla capacidade de sobrevivência a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos. Existem muitos métodos de controle de plantas daninhas nas áreas agrícolas, entre eles, destaca-se o controle químico, que é uma forma de controle que propicia estresse severo o suficiente para paralisar o crescimento e desenvolvimento e/ou até mesmo provocar a morte das plantas daninhas.

As espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* são plantas daninhas que apresentam tolerância ao herbicida glyphosate, e essa característica propicia a essas espécies daninhas se tornarem problema em áreas onde o uso de glyphosate é recorrente, por meio da seleção de espécies tolerantes ou mesmo pela seleção de biótipos com maior tolerância dentro da espécie tolerante. Tal situação encontra-se em lavouras de soja na região Sudoeste do Paraná e é motivo dos estudos efetuados no Capítulo 1 da presente tese, em que são descritos estudos para identificar a variabilidade da tolerância de biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* ao herbicida glyphosate.

Na prática, no princípio do manejo de espécies infestantes em áreas com soja geneticamente modificada, os agricultores da região sudoeste do Paraná obtinham controle satisfatório de plantas em estádios de desenvolvimento precoce das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com doses ao redor de 720 g ha⁻¹ de e.a. de glyphosate. Presentemente, a utilização de doses muito superiores a essa (média de 1080 g ha⁻¹ de e.a.) resulta em níveis de controle abaixo do satisfatório. Na presente tese foram investigadas 14 populações da espécie *B. latifolia* e 11 populações da espécie *R. brasiliensis*, e evidenciou-se grande variabilidade de redução da MPAS entre elas, pois as doses necessárias para reduzir a MPAS em 80% aos 28 DAA, variaram de 17 à >1742 g ha⁻¹ de e.a. para os biótipos de *R. brasiliensis* e de 115 à 1033 g ha⁻¹ de e.a. para os biótipos de *B. latifolia*.

Em geral, foi demonstrado que as doses necessárias para o controle

de biótipos de ambas as espécies, coletados em áreas sem pressão de seleção, eram menores do que as necessárias para controlar biótipos submetidos à pressão de seleção por glyphosate. Atualmente, em muitas propriedades da região Sudoeste do Paraná e Norte de Santa Catarina tem ocorrido intensificação das aplicações de glyphosate, tanto na cultura da soja RR e mais recentemente na cultura do milho RR, onde emprega-se diversas aplicações desse herbicida, nos processos de dessecação das áreas, e também em pré e pós-emergência das culturas. Essa grande variabilidade de níveis de controle e o fato que biótipos coletados em áreas com baixa pressão de seleção por glyphosate tenham apresentado valores de C_{50} mais baixos evidenciam que está havendo seleção de biótipos com respostas distintas ao herbicida glyphosate em áreas com grande exposição a esse herbicida.

Essa evolução é dependente da pressão de seleção, da variabilidade genética da espécie daninha, do número de genes envolvidos, do padrão de herança, do fluxo gênico e da dispersão de propágulos. A grande variabilidade genética existente em populações de plantas de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* juntamente com a grande pressão de seleção imposta pelo herbicida glyphosate, permitirá que os indivíduos com maior tolerância sobrevivam e produzam sementes, e assim ocupem os nichos disponíveis no ambiente, deixado pelas plantas sensíveis que serão controladas pelo herbicida.

Na presente tese, os marcadores RAPD foram satisfatórios em detectar polimorfismo entre biótipos de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* com respostas contrastantes ao herbicida glyphosate (capítulo 4). Essa baixa similaridade era esperada, pois em geral as espécies daninhas apresentam elevada variabilidade genética entre plantas de uma população ou entre populações, uma vez que se desenvolvem e evoluem em múltiplos ambientes, expostas a fatores agrônômicos de manejo como o uso intensivo de inibidores da EPSPS e ausência de rotação de herbicidas com mecanismos de ação diferenciados (HOLT; HOCHBERG, 1997; WINKLER et al., 2002; RADOSEVICH et al., 2007). Isso pode também estar relacionado ao fato de muitas espécies daninhas apresentarem características de flores que propiciam a fecundação cruzada (heterostilia), o que favorece a alogamia, contribuindo para a elevada variabilidade intraespecífica nessas espécies.

Existem pelo menos seis mecanismos gerais que podem explicar a

tolerância de plantas daninhas a herbicidas, entre eles a absorção e translocação reduzidas, maior metabolização do herbicida para substâncias com menor atividade fitotóxica, compartimentalização da molécula herbicida, falta de afinidade do herbicida com o local de ação específico e super-expressão da enzima alvo. Na presente tese, a avaliação da absorção e translocação com a utilização de glyphosate marcado radioativamente, permitiu concluir que a translocação diferencial e menor absorção foliar do herbicida em biótipos com níveis de tolerância distintos foram os mecanismos que contribuíram como a maior tolerância, para ambas as espécies. Porém, como as diferenças entre biótipos não têm magnitude muito elevada, é possível que outros mecanismos estejam envolvidos. A translocação é um processo essencial para a boa eficácia do herbicida glyphosate (WANAMARTA; PENNER, 1989).

Devido à existência de diferenças de constituição entre as ceras epicuticulares (lipofílicas) e herbicidas de natureza hidrofílica, como o glyphosate, as mesmas tornam-se a barreira mais significativa para a sua absorção via foliar. O estudo do efeito do estresse hídrico sobre a produção de ceras epicuticulares, efetuado no Capítulo 3, indica que sua produção foi incrementada pelo déficit hídrico, com maior ênfase nos biótipos mais tolerantes ao glyphosate, tanto em *Richardia brasiliensis* quanto em *Borreria latifolia*, tornando-se uma barreira para a absorção de glyphosate por esses biótipos, o que significa também a existência de menor concentração de glyphosate disponível para a translocação.

Evidencia-se que a quantidade de água disponível ao crescimento das plantas pode interferir de forma relevante no controle químico das ervas daninhas. Os resultados indicaram também que aplicações de glyphosate sobre plantas em estresse hídrico, existe a tendência de ocorrer decréscimo nos níveis de controle, que poderá variar conforme os níveis do estresse. Também foi possível observar correlação significativa entre tolerância do biótipo ao glyphosate e a capacidade de deposição de cera epicuticular sobre as folhas quando submetidos a estresse hídrico.

O nível crítico de dano ou parâmetro i (VIDAL; PORTUGAL, 2010) do modelo tipo hipérbole retangular evidenciou que cada planta de *B. latifolia* e *R. brasiliensis* por m^2 foi capaz de reduzir em aproximadamente 5 e 2% a produtividade

da soja V-TOP, já para a cultivar BMX ATIVA cada planta por m² de *B. latifolia* foi responsável pela perda de 6% do rendimento de grãos, valor maior à perda percentual de rendimento de grãos ocasionada por *R. brasiliensis*, que foi de 2%. Como exemplo, estudo com plantas infestantes das espécies *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia* reduziram a produtividade da soja em 1,58 e 0,69%, respectivamente (RIZZARDI et al., 2010). Em outro estudo, plantas de *Conyza bonariensis* implantadas no mesmo dia da semeadura da soja resultaram em perda de apenas 0,97% do rendimento (TREZZI et al., 2015). Os resultados obtidos com os estudos da presente tese, em comparação com outros efetuados na região Sul do país evidenciam perdas de rendimento extremamente significativas.

Diante das elevadas perdas potenciais de dano das espécies *B. latifolia* e *R. brasiliensis*, em cultivares modernas de soja (V-TOP RR e BMX ATIVA RR), os resultados da presente tese indicam grande importância do manejo adequado dessas infestantes, a fim de evitar perdas acentuadas no rendimento de grãos. Entre elas, priorizar práticas de manejo que objetivem a redução da emergência destas espécies daninhas rubiáceas podem ser benéficas, pois impediriam a interferência precoce com a planta cultivada, misturas em tanque de herbicida residuais com glyphosate ou aplicações sequenciais com herbicidas de outros mecanismos de ação representam uma importante estratégia para o controle dessas espécies. Por fim, e não menos importante, a rotação de culturas é uma ferramenta valiosíssima para reduzir infestações e melhorar a eficiência de controle das espécies daninhas em áreas agricultáveis, pois possibilita a cobertura de solo durante grande parte do tempo, além de propiciar a rotação dos mecanismos de ação herbicida.

O conhecimento desses pontos é importante para embasar previsões de proporções futuras entre plantas tolerantes ao glyphosate porém com biótipos que apresentem diferentes respostas de controle, com maior tolerância ou sensíveis, em áreas infestadas e para eleger métodos de manejo e controle das plantas com maior tolerância que permitam impedir a multiplicação e a disseminação dos genes para outras populações. Tem sido dada pouca atenção ao problema da tolerância de plantas daninhas ao glyphosate no Brasil. Quase todas as pesquisas desenvolvidas estão direcionadas à busca de soluções para o surgimento de biótipos resistentes.

Como já supracitado, a tolerância de plantas daninhas a herbicidas, assim como a resistência, podem levar o agricultor a sérios prejuízos, principalmente relacionado com o aumento nas doses do herbicida aplicado (fitotoxicidade em culturas/grandes impactos ao ser humano e ao meio ambiente) e elevando os custos de produção e na quantidade e qualidade do produto final produzido.

REFERÊNCIAS

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier. p. 37- 67, 2009.

ALI, A. Use of image analysis to assess color response on plants caused by herbicide application. **Weed Technology**, v.27, n.3, p.604–611, 2013.

AREIAS, R. G.B. M.; DE PAIVA. D. M. P.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteína nos grãos. **Bragantia**, v.65, n.1, p.19-28, 2006.

BAKER, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. (Ed.). *The plant cuticle*. London : Academic Press, 1982. p. 140-161.

BARRETT, S. C. H. *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. Berlin, 1992.

BENEDETTI, J. G. R. Período anterior à interferência de plantas daninhas em soja transgênica. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.4, p.289-295, 2009.

BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HUETTEL, B.; STAGINNUS, C.; MUEHLBAUER, F.J.; KAHL, G.. Molecular markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, v.107, p.379-386, 2003.

BONFLEUR, E. J. et al. Mineralization and degradation of glyphosate and atrazine applied in combination in a Brazilian Oxisol. **J. Environ. Sci. Health B.**, v. 46, n. 1, p. 69-75, 2011.

BORGATO, E.A.; NETTO, A.G. Resistência múltipla e cruzada: casos no Brasil e mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: CHRISTOFFOLETTI, P.J.; NICOLAI, M. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: ESALQ, 4. Ed., 2016.

BRUNHARO, C.A.C.G; PATTERSON, E.L.; CARRIJO, D.R.; DE MELO, M.S.C.;NICOLAI, M.; GAINES, T.A.; NISSENB, S.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J.. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest Manag. Sci.**, v.72, p.1758–1764, 2016.

BRUNHARO, C.A.C.G; PATTERSON, E.L.; CARRIJO, D.R.; DE MELO,

M.S.C.; NICOLAI, M.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J.. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest Manag. Sci.**, v.72, p.1758–1764, 2016.

BURHLER, W. Mechanisms of Herbicide Resistance. In: **Pesticide Environmental Stewardship Promoting Proper Pesticide Use and Handling**. Disponível em <<https://pesticidestewardship.org/resistance/Herbicide/Pages/Mechanisms-of-Herbicide-Resistance.aspx>>. Acesso em 04 de outubro de 2016.

BURHLER, W. Mechanisms of Herbicide Resistance. In: **Pesticide Environmental Stewardship Promoting Proper Pesticide Use and Handling**. Disponível em <<https://pesticidestewardship.org/resistance/Herbicide/Pages/Mechanisms-of-Herbicide-Resistance.aspx>>. Acesso em 04 de outubro de 2016.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. 2ªed., 532 p., 2009.

CARDINALI, V.C.B.; DIAS, A.C.R.; MUELLER, T.C.; ABERCROMBIE, L.; STEWART JR.; C.N.; TORNISIELO, V.L. e CHRISTOFFOLETI, P.J. Shikimate accumulation, glyphosate absorptions and translocations in horseweed biotypes. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2015.

CARDOSO, L. R. et al. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no estado de São Paulo. **Planta Daninha**, v. 20, p. 1-5, 2002.

CARVALHO L.B. et al. Pool of resistance mechanisms to glyphosate *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.2, p.615–622, 2012.

CARVALHO, L.B. et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v.59, n.2, p.171-176, 2011.

CASELEY, J. C.; COUPLAND, D. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. A. (Ed.). The herbicide glyphosate. London: Butterworths, p. 92-123, 1985.

CECHIN, J. et al. Dessecação tardia de *Richardia brasiliensis* na pré semeadura da soja com glifosato e misturas. **Anais... XVI SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO- UNIFRA: Santa Maria**. Disponível em: <<http://www.unifra.br/eventos/sepe2012/Trabalhos/5533.pdf>>, 2012.

CERDEIRA, A. L. Et al. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate – resistant soybean in Brazil. **J. Environ. Sci. Health (B)**, v. 42, n. 5, p. 539-549, 2007.

CERDEIRA, A.L. et al. Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in South America. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5799-5807, 2010.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and central of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science**, v. 49, p. 156- 163, 2001.

CHATHAM, L.A.; WU, C.; RIGGINS, C.W.; HAGER, A.G.; YOUNG, B.G.; ROSKAMP, G.K. e TRANEL, P.J. EPSPS gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. **Weed Technology**, v. 29, p. 48-55, 2015.

CHAUHAN, B. S.; ABUGHO, S. B. Threelobe Morningglory (*Ipomoea triloba*) germination and response to herbicides. **Weed Science**, v.60, n.2, p.199-204, 2012.

CHAVAN, J.J.; GAIKWAD, N.B.; KSHIRSAGAR, P.R.; UMDALE, S.D.; BHAT, K.V.; DIXIT, G.B.; YADAV, S.R. Highly efficient in vitro proliferation and genetic stability analysis of micropropagated *Ceropegiaevansii* by RAPD and ISSR markers: A critically endangered plant of Western Ghats. **Plant Biosystem**, v. 149, p.442-450, 2013.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Glyphosate sustainability in South America cropping systems. **Pest Management Science**, v. 64, p. 422-427, 2008.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Londrina: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), p. 2-21, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta daninha**, v.21, n.3, 2003.

COLE, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pestic. Sci.**, v. 42, p. 209-222, 1994.

CORREIA, N. M.; LEITE, G. J.; GARCIA, L. D.. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis* ao herbicida glyphosate. **Planta daninha**, v.28, n.4, 2010.

CORREIA, N.M.; DURIGAN, J. C. Controle de plantas daninhas na cultura de soja resistente ao glyphosate. **Bragantia**, v.69, n.2, p.319-327, 2010.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química**

Nova, v.23, p. 4, 2000.

COUPLAND, D. Metabolism of glyphosate in plants. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Eds.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworth, p. 25-33, 1985.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p., 2006.

CUSSANS, G. W.; COUSENS, R. D.; WILSON, B. J. Thresholds for weed control - The concepts and their interpretation. In: **EWRS SYMPOSIUM WEED CONTROL**, 1986, Brighton. Proceedings... Brighton: p.253-260, 1986.

DELLACIOPPA, G. N. et al. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 83, p. 6873-6877, 1986.

DELPRETE, P. The status of monographic and floristic studies of Neotropical Rubiaceae, with emphasis on the Flora of The Guianas. **Flora of the Guianas Newsletter**, v. 12, p. 11-13, 1999.

DIAS, A. C. R.; CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Fenologia da trapoeraba como indicador para tolerância a herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 31, n. 1, p. 185-191, 2013.

DIAS, N.M.P. et al. Absorção e translocação do herbicida diuron por espécies suscetível e tolerante de capim-colchão (*Digitaria* spp.). **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.293-300, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DUKE, S. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. **J Agric. Food Chem.** v. 59, p. 5835-5841, 2011.

DURIGAN, J. C.; GALLI, A.J.B.; LEITE, G. J. Avaliação da eficiência da mistura de glyphosate e 2,4-D para o controle de plantas daninhas em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 17., 1988, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: SBEHD, p. 303-304, 1988.

DWIATI, M.; SUSANTO, A. H. Molecular Analysis of *Synedrela nodiflora* (L.) Gaertn. Resistance Against Fomesafen using Rapid Markers. **Bioesfera**, v. 32, n.1, p. 11-18, 2015.

DYER, W. E. Resistance to glyphosate. In: POWLES S. B.; HOLTUM J. A. M. (Eds.). **Herbicide resistance in plants**. Boca Raton: CRC Press, p. 229-241, 1994.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Cnpso, 412 p., 2006.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030, Porto Alegre, 4p., 2008.

FAO. How to Feed the World in 2050?. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf> Acesso em 26 de novembro, 2013.

FERREIRA, E. A. et al. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 365-370, 2006.

FERREIRA, E. A. F.; CONCENÇO, G.; VARGAS, L.; SILVA, A. A. Manejo de plantas daninhas tolerantes ou resistentes ao glyphosate no Brasil. Capítulo 15, p. 357-400. In: VELINI, E. D.; MESCHEDE, D. K.; CARBONARI, C. A.; TRINDADE, M. L. B. Glyphosate. Editora Fepaf, 493 p., 2009.

FERREIRA, E. A. F.; CONCENÇO, G.; VARGAS, L.; SILVA, A. A. Manejo de plantas daninhas tolerantes ou resistentes ao glyphosate no Brasil. Capítulo 15, p. 357-400. In: VELINI, E. D.; MESCHEDE, D. K.; CARBONARI, C. A.; TRINDADE, M. L. B. **Glyphosate**. Editora Fepaf, 493 p., 2009.

FERREIRA, E.A. et al. Glyphosate translocation in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. **Planta Daninha**, v.26, p.637-643, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p., 1998.

FERREIRA, C. R. R. P. T.; CAMARGO, M. L. B.; VEGRO, C. L. R. Defensivos Agrícolas: vendas batem novo recorde em 2012 e segue em ritmo forte em 2013. Disponível em:< <http://www.iea.sp.gov.br/out//LerTexto.php?codTexto=12700>>. Acesso em 19 de setembro, 2012.

FLECK, N.G. et al. Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. **Planta Daninha**, Viçosa, v.26, n.1, p.101-111, 2008.

FRANS, R.R. et al. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In N. D. Camper, ed. **Research Methods in Weed Science**. 3rd ed. Champaign, IL: Southern Weed Science Society. p.37-38, 1986.

FREITAS, L.B.; JERUSALINSKY, L.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. Extreme homogeneity among Brazilian Wheat genotypes determined by RAPD markers.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 35, n. 11, p. 2255-2260. 2000.

GAINES, T. A. et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proc. National Academy Sci.**, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GALON, L. et al. Glyphosate translocation in herbicide tolerant plants. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 193-201, 2013.

GALON, L.; FERREIRA, E.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.; VARGAS, L.. Tolerância de culturas e plantas daninhas a herbicidas. IN: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo:Berthier, 2009.

GALVAN, J; RIZZARDI, M.A; SCHEFFER-BASSO, S.. Aspectos morfofisiológicos de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) sensíveis e resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1107-1112, 2011.

GANDERS, F.R.. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany**, v.17, p.607-635, 1979.

GAZZIERO, D.L.P. et al. Critérios para relatos oficiais estatísticos de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.) **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, p.91-101, 2009.

GAZZIERO, L.P.D.; VARGAS, L.; ROMAN, E.S. Manejo e controle de plantas daninhas em soja. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Manual e controle de plantas daninhas**. EMBRAPA, p.595 – 635, 2004.

GE, X., DAVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J.; SAMMONS D. In Vivo ³¹P-NMR Studies of Glyphosate Uptake, Vacuolar Sequestration, and Tonoplast Pump Activity in Glyphosate Resistant Horseweed (*Conyza canadensis*). **Plant Physiol.**, v.166, n.2, 2014.

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J. H.; SAMMONS, R. D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Manag Sci.**, v.66, p.345–348, 2010.

GE, X.; D'AVIGNON, D.A.; ACKERMAN, J.J.H. e SAMMONS, R.B. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, v. 66, p. 345-348, 2009.

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J.; COLLAVO, A., SATTIN, M.; OSTRANDER, E. L.; HALL, E. L.; SAMMONS, R. D.; PRESTON, C. Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium*

spp.) from Australia, South America, and Europe: a ³¹P NMR investigation. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, n.5, 2012.

GHANIZADEH, H., KC HARRINGTON, K.C. & JAMES, T.K.: Genetic inheritance of restricted herbicide translocation in a glyphosate resistant *Lolium perenne* population. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.59, p.269-279, 2016.

GIBSON, K.; FISCHER, A. J. Competitiveness of rice cultivars as a tool for crop-based weed management. **Weed Biology and Management**, Dordrecht: Kluwer, p.518-537, 2004.

GOGGIN, D.E.; CAWTHRAY, G.R. e POWLES, S.B. 2,4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 11, p. 3223-3235, 2016.

GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; BORGATO, E.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Multiple Resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS Inhibiting Herbicides in State of Mato Grosso, Brazil. **Planta daninha**, v.34, n.3, p.581-587, 2016.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A.; DE PRADO, R. First evidence for a target site mutation in the EPSPS2 gene in glyphosate-resistant Sumatran fleabane from citrus orchards. **Agron. Sustain.** v.34, p.553–560, 2014.

GREEN-TRACEWICZ, E.; PAGE, E.R.; SWANTON, C.J. Light Quality and the Critical Period for Weed Control in Soybean. **Weed Science**, v.60, p.86–91, 2012.

HALL, L.M.; STROME, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, v.46, n.1, p.390-396, 1998.

HART, J.J.; DI TOMASO, J.M. Sequestration and Oxygen Radical Detoxification as Mechanisms of Paraquat Resistance. **Weed Science**, v.42, p.277-284, 1994.

HARTZLER, B. Absorption of foliar herbicides. Fevereiro, 2001. Disponível em: <<http://www.weeds.iastate.edu/mgmt/2001/absorp.htm>>. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

HATTERMAN-VALENTI, H. et al. Effect of environment on giant foxtail (*Setaria faberi*) leaf wax and fluazifop-P absorption. **Weed Science**, v. 54(4) p. 607-614, 2006.

HATTERMAN-VALENTI, H.; PITY, A.; OWEN, M. Environmental effects on Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Epicuticular wax deposition and herbicide

absorption. **Weed Science**, v.59, n.1, p.14-21, 2011.

HEAP, I.A. **Criteria for confirmation of the herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em 25 de outubro, 2006.

HENRY, W.B., *et al.* Remote sensing to detect herbicide drift on crops. **Weed Technology**, v. 18, n.1, p. 358–368. 2004.

HEREDIA, F. J. *et al.* Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes, pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 491-498, 1998.

HERNANDES, G. C. Resistência de *Bidens* spp. aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: análise de populações com marcadores moleculares e estratégias para seu manejo. 2004. 109 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

HESS, F. D.; CHESTER, L. F. Interaction of surfactants with plant cuticles. **Weed Technology**, v.14, p.807-813, 2000.

HESS, M. *et al.* Use of the extended BBCH scale – general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Res.**, v. 37, n. 6, p. 433-441, 1997.

HETHERINGTON, P. *et al.* The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **J. Exp. Bot.**, v. 50, p. 1567-1576, 1998.

HOLT, R D.; HOCHBERG, M. E. When is biological control evolutionary stable (or is it?). **Ecology**, v. 78, n. 14, p. 1673-1683, 1997.

HUANG, Y., *et al.* Airborne remote sensing assessment of the damage to cotton caused by spray drift from aerially applied glyphosate through spray deposition measurements. **Biosystems Engineering**, v.107, n.3, p.212–220, 2010.

JEFFERSON, P.G.; JOHNSON, D.A.; ASAY, J.H.. Epicuticular wax production, water status and leaf temperature in triticale range species of contrasting visible glaucousness. **Canadian Journal Plant Science**, v.69, n.2, p.513-519, 1989.

JOHN P. H. READE, LUCY J. MILNER AND ANDREW H. COBB. A Role for Glutathione S-Transferases in Resistance to Herbicides in Grasses. **Weed Science**, V. 52, N. 3, p. 468-474, 2004.

JORDAN, D.L. *et al.* Influence of application variables on efficacy of glyphosate. **Weed Technology**, v. 11, p. 354-362., 1997.

JUGULAM, M.; NIEHUES, K.; GODAR, A.S.; KOO, D.H.; DANILOVA, T.; FRIEBE, B.; SEHGAL, S.; VARANASI, V.K.; WIERSMA, A.; WESTRA, P.; STAHLMAN, P.W. e GILL, B.S. Tandem amplification of a chromosomal segment harboring 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase locus confers glyphosate resistance in *Kochia scoparia*. **Plant Physiology**, v. 166, p. 1200-1207, 2014.

KAPUSTA, G.; KRAUSZ, R.E.; MATTHEWS, J.L. Soybean tolerance and summer annual weed control with glufosinate and glyphosate in resistant soybeans. Proc. North Cent. **Weed Science**. Soc. 49, p. 120, 1994.

KIRKWOOD, R.C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop weed species. **Pesticide Science**, v.42, p.241-249, 1994.

KISSMANN, K.G. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2003. Disponível em: <http://www.hracbr.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas.doc>. Acesso em: 27 de outubro de 2016.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 683 p., 1995.

KLEIN, V. A. **Propriedades físico-hídrico-mecânicas de um latossolo roxo, sob diferentes sistemas de uso e manejo**. 150p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 1998.

KOMOBA, D. et al. Plant metabolism of herbicides with C-P bonds glyphosate. **Pesticide, Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 85-94, 1992.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.R. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.1, n.2, p.139-146, 2000.

LA ROSA, T.M.; LETHO, T.; APHALO, P.J. Does far-red light affect growth and mycorrhizas of Scots pine seedlings grown in forest soil?. **Plant and Soil, The Hague**, v. 211, n.2, p.259-268, 1999.

LACERDA, A.L.S.; VICTORIA FILHO, R. Curvas dose-resposta em espécies de plantas daninhas com o uso do herbicida glyphosate. **Bragantia**, v. 63, n. 1, p. 73-79, 2004.

LAMEGO, F. P.; RESENDE, L. V.; SILVA, P. R.; VIDAL, R. A.; NUNES, A. L. Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 963-968, 2006.

LAMEGO, F.P. et al. Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. **Weed Science**, v.57, n.5, p.474-481, 2009.

LAMEGO, F.P.; KASPARY, T.E.; RUCHEL, Q.; GALLON, M.; BASSO, C.J.; SANTI, A.L.. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. **Planta daninha**, v.31 n.2, 2013.

LAMEGO, F.P.; RESENDE, L.V.; SILVA, P.R.; VIDAL, R.A.; NUNES, A.L. Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.6, p.963-968, 2006.

LI, P. & JOHNSTON, M.O. 2001. Comparative floral morphometrics of distyly and homostyly in three evolutionary lineages of *Amsinckia* (Boraginaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.79, p.1332-1348, 2001.

LIAKOPOULOS, G.; STAVRIANOKOU, S.; KARABOURNIOTIS, G. Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europea* leaves, evidence for the chemical origin of the u.v. induced blue fluorescence of stomata. **Annals of botany**, v. 87, p.641-648, 2001.

LIU, B.; CHEN, S.; YANG, Y.; WANG, L.; HOU, D. RAPD Analysis on Genetic Diversity of Pinellianternata (Thunb.) Breit in different populations. **Medicinal Plant**, v.5, n.6, p. 7-10, 2014.

LOPES S.J. *et al.* Estimativa da área foliar de meloeiro em diferentes estádios fenológicos por fotos digitais. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1153-1156, 2007.

LORENTZ, L. *et al.* Characterization of Glyphosate Resistance in *Amaranthus Tuberculatus* Populations. **J Agric Food Chem**, v.62, n.32, p.8134-8142, 2014.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 640 p., 2008.

MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat: sistema de análise estatística para Windows. Versão Beta**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. (Software).

MACHADO, R. A.; COSTA, A. G. F.; ALVES, P. L. C. A.; KAWAGUCHI, I. T. Efeito do estresse hídrico sobre a eficiência do halosulfuron no controle de tiririca. **Planta daninha**. vol.18, n.2, pp. 265-275. Viçosa, 2000.

MACIEL, C.D.G. *et al.* Misturas em tanque com glyphosate para o controle de trapoeraba, ervade-touro e capim-carrapicho em soja RR[®]. **Revista Ceres**, v. 58, n.1, p.35-42, 2011.

MACMAHON, M. J.; KELLY, J. W.; DECOTEAU, D. R.; YOUNG, R.E. & POLLOCK, RK. 1991. Growth of *Dendranthema x Grandiflorum* (Ramat.) Kitamura under various

spectral filters. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.116, p.950-954, 1991.

MANTEL, N.. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p.209-220, 1967.

MARTINS, B.A.B. **Biologia e manejo da planta daninha *Borreria densiflora* DC.** 2008. 169 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba 2008.

MARTINS, B.A.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J.. Herbicide efficacy on *Borreria densiflora* control in pre- and post-emergence conditions. **Planta daninha**, v.32, n.4, 2014.

MARTINS, J.R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SILVA et al. Anatomia foliar de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n1, 2009.

MATIELLO, R. R.; RONZELLI JÚNIOR, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agronômicos e genéticos. In: Curso de manejo de resistência de plantas daninhas aos herbicidas, 2., Ponta Grossa, 1999. **Anais...** Ponta Grossa: AEA-CG, p.91-107,1999.

MCWHORTER, C. G.; OUZTS, C. Leaf surface morphology of *Erythroxylum* sp and droplet spread. **Weed Science**, v. 42, p. 18-26, 1994.

MEROTTO JR., A.; FISCHER, A.J.; VIDAL, R.A. Perspectives for using light quality knowledge as an advanced ecophysiological weed management tool. **Planta daninha**, v.27, p.407-419, 2009.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. Revista: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 2003.

MIR, R. R.; VARSHNEY, R. K.. Future prospects of molecular markers in plants. In: R.J. Henry, editor, Molecular markers in plants. **Blackwell Publishing Ltda.**, Oxford, UK. p. 170–190, 2013.

MONQUERO, P.A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate.** 2003. 99f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MONQUERO, P.A. et al. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v. 22, p. 445-451, 2004.

MONQUERO, P.A. et al. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, Vicosa-MG, v.22, n.2, p.203-210, 2004.

MONQUERO, P.A. et al. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 123-132, 2005.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação frequente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n.1, p. 63-69, 2003.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; SANTOS, C.T.D. Glyphosate em mistura com herbicidas alternativos para o manejo de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.19, n.3, p.375-380, 2001.

MONQUERO, P. A.; HIRATA, A. C. S. Comportamento de herbicidas nas plantas. In: MONQUERO, P. A. Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas. Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 1ªed., São Carlos – SP: RIMA, 430 p., 2014.

MOODIE, M.; FINCH, P. R.; MARSHALL, G. Analysis of genetic variation in wild mustard (*Sinapsis arvensis* L.) using molecular markers. **Weed Science**, v. 45, n. 3, p. 102-107, 1997.

MOREIRA, H.J.C.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de identificação de plantas infestantes**: cultivos de verão. Campinas: FMC. 642 p., 2010.

MOULIN, M. M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A.; SUDRÉ, C. P.; PEREIRA, M. G. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 2, p. 139-147, 2012.

NCBI. GenBank growth. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbankstats.html>>. Acesso em: 06 de julho de 2016.

NEVE, P. et al. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* II: past, present and future of glyphosate use in Australian cropping. **Weed Research**, v.43, n.6, p. 418-427, 2003.

NOHATTO, M. A. **Resposta de *Euphorbia heterophylla* proveniente de lavouras de soja Roundup Ready® do RioGrande do Sul ao herbicida glyphosate**. 2010.

NORSWORTHY, J.K.; BURGOS, N.R.; OLIVER, L.R. Differences in weed tolerance

to glyphosate involve different mechanisms. **Weed Technology**, v. 15, p. 725–731, 2001.

OERKE, E. - C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**. v. 144, p. 31 – 43, 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; BACARIN, M. A. Absorção e translocação de herbicidas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. (Coords.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, p. 261-290, 2001.

OLIVEIRA, J. A.; SALIMENA, F. R. G.; ZAPPI, D. Rubiaceae da Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Rodriguésia**, v.65, n.2, p.471-504, 2014.

OLIVEIRA, R, S, JR,; BACARIN, M, A. Absorção e translocação de herbicidas. In: OLIVEIRA, JR, S, R; CONSTANTINI, J; INOUE, M,H. (Eds). *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Ominipax, 226p., 2011.

ORNDUFF, R. Heterostyly in South African flowering plants: A conspectus. **Journal of South African Botany**, v.40, n.3, p.169-187, 1974.

PAPA, C.J.M.; FELIZIA, J.C.; ESTEBÁN, A.J. Cambios en la flora de malezas como consecuencia de cambio tecnológico en Argentina: malezas novedosas que pueden afectar al cultivo de la soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., Foz do Iguaçu, 2002. **Anais...** Foz do Iguaçu: EMBRAPA, 2002. p. 346 – 354, 2002.

PAUSCH, R.C. et al. Growth and photosynthesis of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in simulated vegetation shade-influence of the ratio of red to far red radiation. **Plant Cell and Environment**, v.14, n.7, p.647-656, 1991.

PAZUCH, D. **Tolerância ao glyphosate e sua absorção e translocação por biótipos de *Ipomoea* spp.** 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

PELAEZ, Victor. Monitoramento do mercado de agrotóxicos. ANVISA e UTFPR. 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/07ee7e0041d81501a0d9f5255d42da10/estudo_monitoramento.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 11 jan., 2010.

PEREIRA, J. L. et al. Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in soybean crop. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 825-830, 2008.

PEREZ-JONES, A.K.; PARK, J.; COLQUHOUN, C.; MALLORY-SMITH, C.; KOGAN, M. Identification of a mutation in the target enzyme EPSP synthase in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* biotype. **Weed Sci. Soc. Am.** Abstr. 416. Lawrence, KS:

WSSA, 2005.

PITELLI, R. A. Competição entre plantas daninhas e plantas cultivadas. In: MONQUERO, P. A. Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas. Editora Rima, p.61-81, 2014.

PITELLI, R.A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, v.11, p.19-27, 1985.

PITELLI, R.A.; MARCHI, S.R. Interferência das plantas invasoras nas áreas de reflorestamento. In: Seminário Técnico sobre plantas daninhas e o uso de herbicidas em reflorestamento, 1., Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, p.110-23, 1991.

PITTELKOW, F.K.; JAKELAITIS, A.; CONUS, L.A.; OLIVEIRA, A.A.; GIL, J.A.; ASSIS, F.C.; BORCHARTT, L. 2009. Interferência de plantas daninhas na cultura da soja transgênica. **Gl. Sci. Technol.** v.2, n.3, p. 38-48, 2009.

PORTUGAL, J.; VIDAL, R.. Definições e terminologia sobre nível crítico de dano (NCD) na herbologia. In: VIDAL, R. A. et al. **Nível crítico de dano de infestantes em culturas anuais**. Porto Alegre: Evangraf., p. 8-13, 2010.

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

PREMACHANDRA, G.S.; SANEOKA, H.; FUJITA, K.; OGATA, S.. Leaf Water Relations, Osmotic Adjustment, Cell Membrane Stability, Epicuticular Wax Load and Growth as Affected by Increasing Water Deficits in Sorghum. **J. Exp. Bot.**, v.43, n.12, p.1569-1576, 1992.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR *primers* applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p.107-112, 1999.

PROCÓPIO, S.O. et al. **Anatomia foliar das plantas daninhas do Brasil**. V.1. Viçosa: UFV., 117 p., 2003.

PROCÓPIO, S.O., MENEZES, C.C.E., BETTA, L.; BETTA, M.. Utilização de chlorimuron-ethyl e imazethapyr na cultura da soja Roundup Ready®. **Planta Daninha**, v.25, p.365-373, 2007.

PYKE, K.; LOPEZ-JUEZ, E. Cellular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. Critical Reviews in Plant Sciences, **Philadelphia**, v.18, n.4, p.517-546, 1999.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J., OLIVEIRA, R. P. DE, FACHINELLO, J. C.

Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Hortic. bras.**, v. 24, n. 1, 2006.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Ecology of weeds and invasive plants**. Third Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, p.454, 2007.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. W. Physiological aspects of competition. In: **Weed ecology: implications for management**. New York: John Willey, p. 217-230, 1997.

RAMIRES, A.C. et al. Glyphosate associado a outros herbicidas no controle de *Commelina benghalensis* e *Spermacoce latifolia*. **Semina**, v. 32, n. 3, p. 883-896, 2011.

RASMUSSEN, J. et al. Assessment of leaf cover and crop soil cover in weed harrowing research using digital images. **Weed Research**, v.47, n.1, p.299–310, 2007.

READE, J. P. H. et al. A role of glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. **Weed Sci.**, v. 52, n. 3, p. 468-476, 2004.

REDDY, K.N.; SINGH, M. Organosilicone adjuvants increased the efficacy of glyphosate for control of weeds in citrus (*Citrus* spp.). **Hort Science**, v.27, n.9, p.1003-1005. 1992.

ROBERTSON, R.R.. Physiological and biochemical characterization of glyphosate resistant *Ambrosia trifida* L. MS Thesis, Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University, West Lafayette, IN (2010).

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**. 3ª ed. Londrina, 675 p., 1995.

RODRIGUES, J. D. Absorção e transporte de solutos nas plantas. In: Velini, E. D.; MESCHEDE, D. K.; CARBONARI, C. A.; TRINDADE, M. L. B. **Glyphosate**. Botucatu: Editora Fepaf, p.31-112, 2009.

ROHLF, F.J.; FISHER D.L. Test for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Zoology**, v.17, p.407-412. 1968.

ROHLF, R. **NTSYS pc version 2.21m. Numerical taxonomy analysis system for windows**. New York, Exeter Softwares, 2007.

ROLDÁN-RUIZ,I.; DENDAUW,J.; BOCKSTAELE, E.V.; DEPICKER, A.; LOOSE, M.DE. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, p. 125-134, 2000.

ROWE, M. L.; LEE, D. J.; BOWDITCH, B. M.; MASTERS, R. A. Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. **Weed Science**, v. 45, p. 446-454, 1997.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

RUBERTI, I.; SESSA, G.; CIOLFI, A.; POSSENTI, M.; CARABELLI, M.; MORELLI, G. Plant adaptation to dynamically changing environment: The shade avoidance response. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1047–1058, 2012.

RUEPPEL, M.L. et al. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 25, p. 517-528, 1977.

RUITER, H.; MEINEN, E.; VERBEEK, A. M. Influence of the type and concentration of surfactant on glyphosate absorption; relevance of drop spreading and drying time. In: FOY, C. L. (Ed.). **Adjuvants for agrochemicals**. Boca Raton: CRC, 735p., 1992.

RUTLEDGE, J.; TALBERT, R. E.; SNELLER, C. H. RAPD analysis of genetic variation among propanil-resistant and susceptible *Echinochloa crus-galli* populations in Arkansas. **Weed Science**, v. 48, n.6, p.669-674, 2000.

SALAS, R.A.; DAYAN, F.E.; PAN, Z.; WATSON, S.B.; DICKSON, J.W.; SCOTT, R.C. e BURGOS, N.R. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*) from Arkansas. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1223-1230, 2012.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A.. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest. Manag. Sci.**, v.70, p.1367–1377, 2014.

SANDBERG, C.L. et al. Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-glyphosate in several weed species. **Weed Research.**, v. 20, p. 195-200, 1980.

SANDBERG, C.L.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-glyphosate in several weed species. **Weed Research**, v.20, n.4, p.195-200, 1980.

SANTOS, I.C. et al. Eficiência de glyphosate no controle de *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa*. **Planta Daninha**, v. 19, p. 135-143, 2001.

SATICHIVI, N. et al. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, v. 48, p. 675-679, 2000.

SATTIN, M. et al. Light quality beneath field grown maize, soybean, and wheat

canopies - red:far red variations. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.2, p.322-328, 1994.

SCALCON, E. L. **Análise de ceras epicuticulares e resposta ao glyphosate em biótipos de *Ipomoea* spp sob duas condições hídricas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco 2013.

SEIFERMAN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiology Plantarum**, v.69, p.561-568, 1987.

SHEPHERD, T.; GRIFFITHS, D. W. The effects of stress on plant cuticular waxes. **New Phytologist**, v.171, n.3, p.469-499, 2006.

SHARMA, S.D.; SINGH, M. Surfactants increase toxicity of glyphosate and 2,4-D to Brazil pusley. **HortScience** v. 36, n. 4, p. 726–728, 2001.

SILVA, A. A. et al. **Controle de plantas daninhas**. Brasília: ABEAS, 260p., 2000.

SILVA, A. A. et al. Herbicidas: Classificação e mecanismos de ação. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Editores). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Ed. UFV, Viçosa, MG., p. 83-148, 2007.

SILVERSTOWN, J. W.; LOVETT DOUST, J. **Introduction to plant population ecology**. Oxford: Blackwell Scientific, 102 p., 1993.

SOKAL R.R.; ROHLF, F.J.. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p.33-40, 1962.

SOUSA, L. A.; BAUTISTA, H. P.; JARDIM, J. G. Diversidade florística de Rubiaceae na Serra da Fumaça – complexo de Serras da Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista Biota Neotropica**, v.13, n.3, p.289-314, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 2005.

SPOONER, D., VAN TREUREN, R.; VICENTE, M. C. **Molecular markers for genbank management**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 126 p., 2005.

STOLLER, E. W.; WOOLLEY, J. T. Competition for light by broadleaf weeds in soybeans (*Glycine max*). **Weed Science**, v. 33,n. 2, p. 199-202, 1985.

SWEENEY, P. M.; DANNEBERGER, T. K. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. **Crop Science**, v.35, n.6, p.1676-1680, 1995.

TAKANO, H.K. *et al.* Controle de *Richardia brasiliensis* e *Spermacoce latifolia* por herbicidas pós-emergentes. In: 8º CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO & I COTTON EXPO 2011. **Anais....** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2011. p.829-834.

TATIKONDA, L.; WANI, S.P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SRUDEVI, T.K.; HOISINGTON, D.A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R.K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jathropa curcas*L. biofuel plant. **Plant Science**, Ottawa, v.176, p.505-513, 2009.

THEISEN, G.; RUEDELL, J.. **Tecnologia de Aplicação de Herbicidas**. Teoria e Prática. Cruz Alta, 90 p., 2004.

TUFFI SANTOS, L. D. *et al.* Efeito do glyphosate sobre a morfoanatomia das folhas e do caule de *Commelina diffusa* e *C. benghalensis*. **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.101-108, 2004.

UOTILA, M.G.; GULLNER, G. KOMIVES, T. Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 689-694, 1995.

VARGAS, L. *et al.* **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 131 p., 1999.

VARGAS, L., BIANCHI, M.A., RIZZARDI, M.A., AGOSTINETTO, D. E DAL MAGRO, T.. Buva (*Conyza bonariensis*) Resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, Viçosa-MG. 25, 573-578, 2007.

VARGAS, L.; GAZZIERO, D.L.P. **Manejo de plantas daninhas tolerantes e resistentes ao glyphosate no Brasil**. IN : RIOS, A. ; FERNÁNDEZ, E. Seminário Internacional Viabilidad del glyphosate en sistemas productivos sustentables. Serie de actividades de difusion 554. Colonia del Sacramento : INIA. p. 69-74. 2008.

VARSHNEY, R.K.; CHABANE, K.; HENDRE, P.S.; AGGARWAL, R.K.; GRANER, A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, Ottawa, v.17, p.638-649, 2007.

VASCONCELOS, M. J. V.; ABDELNOOR, R. V.; KARAN, D.; ALMEIDA, A. M. R.; OLIVEIRA, M. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética em biótipos de leiteiro de Londrina/PR. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 18, n. 2, p. 285-

291, 2000.

VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.15, n.12, p.152-161, 1997.

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

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. **Herbicidologia**. 1ª ed. Porto Alegre, RS: Evangraf, 152 p., 2001.

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. **Inicialismo**. In: VIDAL, R. Interação Negativa entre Plantas: inicialismo, alelopatia e competição. Cáp. 2, p. 33-49, Editora Evangraf Ltda. 2010.

VIDAL, R. **Ação dos herbicidas (absorção, translocação e metabolização)**. Editora Evangraf, Porto Alegre. 89 p., 2002.

VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Palotti, 165p., 1997.

VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JR., A. (Eds.). **Herbicidologia**. Porto Alegre, p.138-148, 2001.

VIDAL, R.A.; PORTUGAL, J. 2010. Formas de cálculo de nível crítico de dano (NCD) de infestantes. p. 13-19. In: VIDAL, R.; PORTUGAL, J.; SKORA NETO, F. Nível crítico de dano de infestantes em culturas anuais. Evangraf, Porto Alegre, RS, Brasil.

VIEIRA, E. L.; SOUZA, G.S de; SANTOS, A. R. dos; SANTOS SILVA. J. dos. **Manual de fisiologia vegetal**. São Luís: EDUFMA, 186p., 2010.

VIEIRA, V. C. Caracterização molecular de acessos de capim-colchão (*Digitaria nuda*) e resposta à ametrina. 58f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VIEIRA, V. C. Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e suas respostas ao glifosato. 52 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VITORINO, H.S. et al. Eficiência de herbicidas no controle de plantas daninhas latifoliadas em mamona. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.1, p.127-131, jan./mar., 2012.

VOLENBERG, D.; STOLTENBERG, D. Altered acetyl-coenzyme A carboxylase confers resistance to clethodim, fluazifop and sethoxydim in *Setaria faberi* and *Digitaria sanguinalis*. **Weed Research**, v.42, p.342- 350, 2002.

WAKELIN, A. M.; PRESTON, C. Target-site glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin). Weed Sci. Soc. Am. Abstr. 417. Lawrence, KS: WSSA, 2005.

WANAMARTA, G. D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Science**, v. 4, p. 215-231, 1989.

WEBSTER, T.M. ; NICHLOS, R.L. Changes in the prevalence of weed species in the major agronomic crops of the southern united states: 1994/1995 to 2008/2009. **Weed Science**, v. 60, n. 2, p. 145-157, 2012.

WESTWOOD, J. H. et al. Absorption and translocation of glyphosate in tolerant and susceptible biotypes of field bindweed (*Convolvulus arvensis*). **Weed Science**. v. 45, p. 658- 663, 1997.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. D. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p. 6531-6535, 1990.

WILSON, R. G. Biology of weed seed in the soil. In: ALTIERI, M. L.; LIEBMMAN, M. (Eds.). Weed Management in agroecosystem: ecological approaches. Boca Raton: CRS Press, 1998. p. 25-39, 1998.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, J. F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **R. Plantio Direto**, v. 70, n. 4, p. 21-24, 2002.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, J. F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.9, p.1067-1072, 2003.

WYRILL, J. B.;BURNSIDE, O.C. Absorption, translocation and metabolism of, 4-D and glyphosate in common milkweed and hemp dogbane. **Weed Science**. v. 24, p. 557–566, 1976.

YU Q., HUANG, S. e POWLES, S. Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 104-109, 2010.

YU, Q., ABDALLAH, I., HAN, H., OWEN, M. e POWLES, S. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibitind herbicides

in multiple herbicide resistant *Lolium rigidum*. **Planta**, v. 230, p. 713-723, 2009.

ZANATTA, J.F. ; PROCÓPIO, S.O.; MANICA, R., PAULETTO, E.A.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L.; SGANZERLA, D.C.; ROSENTHAL, M.D.A.; PINTO, J.J.O.. Teores de água no solo e eficácia do herbicida glyphosate no controle de *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v.25, n. 3, p. 799-811,2007.

ZANATTA, T.S.C; ZANATTA, J.F. Aplicações da biotecnologia no estudo de plantas daninhas. **Revista Científica da Faculdade de Balsas**, An III, n.3, 2012.

ZARPELLON, A. L. et al. Diferentes momentos de aplicação do herbicida glifosato no manejo de plantas daninhas. **Anais... XXVIII CBCPD**, Campo Grande, MS. Disponível em: <http://www.congressosbcpd.com.br/sistema-inscricoes/documentos_cientificos/pdf/453_XXVIICBCPD.pdf>. 2012.

ÍNDICE DE APÊNDICES

<p>APÊNDICE 1 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de <i>Borreria latifolia</i> às doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e da massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.</p>	167
<p>APÊNDICE 2 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de <i>Richardia brasiliensis</i> às doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e a massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....</p>	167
<p>APÊNDICE 3 – Resumo da análise de variância dos teores de ceras dos biótipos de <i>Borreria latifolia</i> e <i>Richardia brasiliensis</i> submetidos à condições hídricas do solo próximos a capacidade de campo e ponto de murcha permanente. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....</p>	167
<p>APÊNDICE 4 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de <i>Borreria latifolia</i> submetidos à condições hídricas do solo próximos a capacidade de campo e ponto de murcha permanente em resposta à doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA), massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.</p>	168
<p>APÊNDICE 5 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de <i>Richardia brasiliensis</i> submetidos à condições hídricas do solo próximos a capacidade de campo e ponto de murcha permanente em resposta à doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA), massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....</p>	168
<p>APÊNDICE 6 – Resumo da análise de variância de estatura (Est), clorofila total (CT), área foliar (AF) em estágio V6, estatura (Est) em estágio R5, em resposta a interferência das espécies <i>Borreria latifolia</i> e <i>Richardia brasiliensis</i> em densidades crescentes na cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....</p>	169
<p>APÊNDICE 7 – Resumo da análise de variância de massa seca (MS), estatura (EST), número de vagem por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV),</p>	

altura de inserção de 1ª vagem (AIP), massa de 1000 grãos (MMG) e perda de rendimento de grãos (PRG) em maturação fisiológica em resposta a interferência das espécies <i>Borreria latifolia</i> e <i>Richardia brasiliensis</i> em densidades crescentes na cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....	169
APÊNDICE 8 – Resumo da análise de variância de estatura (Est), clorofila total (CT), área foliar (AF) em estágio V6, estatura (Est), clorofila total (CT) e área foliar (AF) em estágio R5, em resposta a interferência das espécies <i>Borreria latifolia</i> e <i>Richardia brasiliensis</i> em densidades crescentes na cultivar de soja BMX ATIVA RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....	169
APÊNDICE 9 – Resumo da análise de variância de massa seca (MS), estatura (EST), número de vagem por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), altura de inserção de 1ª vagem (AIP), massa de 1000 grãos (MMG) e perda do rendimento de grãos (PRG) em maturação fisiológica em resposta a interferência das espécies <i>Borreria latifolia</i> e <i>Richardia brasiliensis</i> em densidades crescentes na cultivar de soja BMX ATIVA RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.....	170

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de *Borreria latifolia* às doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e da massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.

Causas da variância	GL	Quadrado Médio		
		14 DAA	28 DAA	MPAS
Biótipos	5	1739,4*	1577,4*	2257,9*
Doses	5	93652,0*	106661,7*	72851,4*
Biótipos X Doses	25	478,9*	743,6*	473,4*
Resíduo	108	24,1	34,6	203,0
CV (%)		8,9	13,1	31,3

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 2 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de *Richardia brasiliensis* às doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e a massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.

Causas da variância	GL	Quadrado Médio		
		14 DAA	28 DAA	MPAS
Biótipos	5	2318,6*	1900,23*	2025,2*
Doses	5	29771,8*	51350,8*	32064,6*
Biótipos X Doses	25	505,6*	570,5*	661,6*
Resíduo	72	23,9	63,13	337,7
CV (%)		7,5	16,36	44,5

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 3 – Resumo da análise de variância dos teores de ceras dos biótipos de *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* submetidos à condições hídricas do solo próximos a capacidade de campo e ponto de murcha permanente. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.

Causas da variância	GL	Quadrado médio	
		<i>Borreria latifolia</i>	<i>Richardia brasiliensis</i>
Biótipos	2	3456,36*	2625,4*
Condição hídrica do solo	1	8217,73*	18706,2*
Biótipos x Condição hídrica do solo	2	692,29*	3235,39*
Resíduo	18	121,36	199,48
CV (%)		11,66	11,98

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 4 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de *Borreria latifolia* submetidos às condições hídricas do solo próximos à capacidade de campo e ponto de murcha permanente em resposta às doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA), massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.

Causas da variância	GL	Quadrado médio			
		14 DAA	28 DAA	MPAV	MPAS
Condição hídrica do solo	1	302,5*	4913,61*	4054,12*	3095,24*
Doses	4	9842,63*	25021,94*	15807,41*	14957,78*
Biótipos	2	231,11*	827,5*	2139,71*	4848,38*
Condição hídrica do solo x doses	4	126,80*	371,94*	649,99*	278,24*
Biótipos x doses	8	58,88*	186,52*	203,47*	434,30*
Condição hídrica do solo x biótipos	2	863,33*	891,94*	82,88 ^{n.s.}	10,35 ^{n.s.}
Condição hídrica do solo x biótipos x doses	8	102,22*	114,86*	105,27*	151,86*
Resíduo	60	8,88	9,72	28,78	32,28
CV (%)		10,14	6,01	9,14	9,62

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 5 – Resumo da análise de variância da resposta dos biótipos de *Richardia brasiliensis* submetidos às condições hídricas do solo próximos à capacidade de campo e ponto de murcha permanente em resposta às doses do herbicida glyphosate, avaliados aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA), massa da parte aérea verde (MPAV) e massa da parte aérea seca (MPAS). UTFPR, Pato Branco – PR, 2016.

Causas da variância	GL	Quadrado médio			
		14 DAA	28 DAA	MPAV	MPAS
Condição hídrica do solo	1	2777,77*	3300,27*	8614,94*	2831,29*
Doses	4	13852,78*	29037,08*	18972,2*	15061,6*
Biótipos	2	3218,61*	3887,77*	8493,78*	9172,99*
Condição hídrica do solo x doses	4	623,61*	488,47*	591,78*	221,30*
Biótipos x doses	8	227,98*	637,08*	706,30*	766,11*
Condição hídrica do solo x biótipos	2	13,61 ^{n.s.}	481,11*	2330,25*	234,72*
Condição hídrica do solo x biótipos x doses	8	93,81*	213,05*	504,57*	395,78*
Resíduo	60	5,83	5,55	4,40	44,78
CV (%)		7,90	4,28	4,05	10,7

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 6 – Resumo da análise de variância de estatura (Est), clorofila total (CT), área foliar (AF) em estádio V₆, estatura (Est) em estádio R₅, em resposta a interferência das espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* em densidades crescentes na cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016

Causas da variação	V6				R5
	GL	Est	CT	AF	Est
Espécie	1	350,45*	17,41 ^{n.s.}	17594,9*	7,80*
Densidade	6	22,52*	2,67 ^{n.s.}	4209,18*	68,64*
Esp. x dens.	6	10,74*	20,40*	1372,15*	6,36*
Resíduo	42	1,05	6,46	128,27	1,46
CV (%)		1,85	5,97	2,88	1,69

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 7 – Resumo da análise de variância de massa seca (MS), estatura (EST), número de vagem por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), altura de inserção de 1ª vagem (AIP), massa de 1000 grãos (MMG) e perda de rendimento de grãos (PRG) em maturação fisiológica em resposta a interferência das espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* em densidades crescentes na cultivar de soja V-TOP RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016

Causas da variação	GL	Maturação fisiológica						
		MS	EST	NVP	NGV	AIP	MMG	PRG
Espécie	1	25436,42*	1,81*	3,53*	0,46*	4,80*	78,07*	343,34*
Densidades	6	8303,98*	67,78*	50,86*	0,81*	5,96*	1998,62*	597,79*
Espécie x densidades	6	1270,87*	8,92*	2,62*	0,04 ^{n.s.}	1,01*	62,87*	24,78*
Resíduo	42	405,62	0,95	0,39	0,02	0,27	17,27	9,21
CV (%)		3,32	1,20	3,06	6,28	4,34	3,37	3,47

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 8 – Resumo da análise de variância de estatura (Est), clorofila total (CT), área foliar (AF) em estádio V6, estatura (Est), clorofila total (CT) e área foliar (AF) em estádio R5, em resposta a interferência das espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* em densidades crescentes na cultivar de soja BMX ATIVA RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016

Causas da variação	GL	V6				R5	
		Est	CT	AF	Est	CT	AF
Espécie	1	0,21 ^{n.s.}	0,27 ^{n.s.}	947,79*	144,58*	278,40*	118619,9*
Densidade	6	63,01*	12,97*	673,28*	118,77*	34,11*	186712,8*
Esp. x dens.	6	4,64*	0,64 ^{n.s.}	92,07*	30,08*	22,33*	48248,01*
Resíduo	42	1,78	2,15	8,20	7,60	1,61	20120,91
CV (%)		2,43	4,95	0,30	3,87	2,86	7,50

* Teste F significativo a 5%

APÊNDICE 9 – Resumo da análise de variância de massa seca (MS), estatura (EST), número de vagem por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), altura de inserção de 1ª vagem (AIP), massa de 1000 grãos (MMG) e perda do rendimento de grãos (PRG) em maturação fisiológica em resposta a interferência das espécies *Borreria latifolia* e *Richardia brasiliensis* em densidades crescentes na cultivar de soja BMX ATIVA RR. UTFPR, Pato Branco – PR, 2016

Causas da variação	Maturação fisiológica							
	GL	MS	EST	NVP	NGV	AIP	MMG	PRG
Espécie	1	20448,85*	625,47*	99,86*	0,004 ^{n.s.}	7,07*	598,67*	313,11*
Densidade	6	5493,69*	105,37*	56,33*	0,88*	1,89*	1903,7*	1418,6*
Esp x dens	6	1153,05*	28,48*	2,11*	0,09*	0,49*	31,46*	132,22*
Resíduo	42	334,98	7,28	0,78	0,02	0,21	13,13	40,69
CV (%)		3,56	3,48	2,85	6,30	3,79	1,67	3,96

* Teste F significativo a 5%