

Curvas de dose-resposta comparativas entre os biótipos resistente e suscetível de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao herbicida glyphosate¹

*Comparative dose-response curves between sourgrass (*Digitaria insularis*) resistant and susceptible biotypes to glyphosate*

Camila Schorr Reinert²; Ana Beatriz Campos Almeida Prado²; Pedro Jacob Christoffoleti³

Resumo - A utilização frequente do glyphosate em sistemas de produção da cultura do citros tem selecionado no Brasil populações resistentes de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) a este herbicida, sendo importante caracterizar os níveis desta resistência para fundamentação de recomendações de medidas racionais de manejo. Sendo assim, foi conduzido um ensaio para elaboração de curvas de dose-resposta comparativa entre dois biótipos da planta daninha capim-amargoso, um resistente (R) e outro suscetível (S) ao herbicida glyphosate. O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação no período de fevereiro a maio de 2012, com cinco doses, do herbicida glyphosate, tendo como base a dose recomendada do herbicida, 900 g e.a. ha⁻¹ (0,0; 450; 900; 1.800; 3.600 e 7.200 g e.a. ha⁻¹), e a planta daninha com 3 a 4 perfilhos no momento da aplicação. Avaliou-se porcentagem de redução da biomassa seca em relação a dose 0,0 e porcentagem visual de controle, aos 14 dias após a aplicação do herbicida. O fator de resistência R/S foi de 16,66, quando baseado na redução percentual da biomassa seca, e de 20,26 quando baseado na porcentagem de controle. Sendo assim, o biótipo R tem um alto grau de resistência, maior que os já relatados na literatura, que estão em dimensões menores que 10. Alto grau de resistência pode indicar que os mecanismos de resistência ao glyphosate neste biótipo são resultantes de alteração no sítio de ação ou super expressão gênica, e não do metabolismo, como geralmente ocorre em plantas daninhas com baixos valores do fator R/S. Para determinação destes mecanismos há necessidade de novos estudos. Conclui-se também que o manejo deste biótipo deve estar fundamentado em herbicidas alternativos ao glyphosate, pois incrementos na dose de glyphosate provavelmente não são viáveis economicamente.

Palavras-chaves: população, fator de resistência, manejo da resistência, estágio de desenvolvimento, citros

Abstract - The frequent use of glyphosate in citrus cropping systems of citrus in Brazil has selected resistant populations of sourgrass (*Digitaria insularis*) to this herbicide, and it is important to characterize this resistance levels for reasons of rational recommendations for management measures. Thus, an assay was conducted to elaborate comparative dose-response curves between two biotypes sourgrass weed, one resistant (R) and one susceptible (S) to glyphosate. The assay was conducted in a greenhouse from February to May 2012, with five doses of the herbicide glyphosate, based on the recommended dose of the herbicide 900 g ae ha⁻¹

¹ Recebido para publicação em 20/09/2013 e aceito em 17/02/2014.

² Aluna do programa de pós-graduação do programa de Fitotecnia da ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: <agroschorr@yahoo.com.br>. (Autor para correspondência).

³ Professor associado do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP

(0.0, 450, 900, 1,800, 3,600 and 7,200 g ae ha⁻¹), and the weed with 3-4 tillers at time of application. It was evaluated the percentage of the dry matter in relation to dose 0.0 of glyphosate, percentage of visual control, 14 days after herbicide application. The resistance factor R/S was 16.66, when based on dry matter and 20.26 when based on the percentage of control. Thus, the R biotype has a high degree of resistance, higher than those previously reported in the literature that are smaller than 10. High degree of resistance may indicate that the mechanisms of glyphosate resistance in this biotype are the result of changes at the site of action or super gene expression, and not to metabolism, as usually occurs in weeds with low values of R/S factor. Further studies are necessary to determine these mechanisms. It was also concluded that the management of this biotype should be based on alternative herbicides to glyphosate, because increments in the dose of glyphosate are probably not economically viable.

Keywords: population, resistance factor, resistance management, growth stage, citrus

Introdução

No reino vegetal, o gênero *Digitaria* abrange cerca de 300 espécies de plantas, distribuídas em diversas regiões do mundo, incluindo as regiões tropicais e subtropicais (Canto-Dorow, 2001). O Brasil é o país do continente americano com maior diversidade de espécies desse gênero, tendo sido constatada a presença de 26 espécies nativas e de 12 exóticas. Destas, 13 foram identificadas somente no Estado de São Paulo (Mondo et al., 2010). As espécies são conhecidas popularmente como capim-colchão e capim-amargoso, possuem desenvolvimento rápido e agressivo em áreas cultivadas e são relatadas como problema em mais de 60 países, infestando mais de 30 culturas de importância econômica (Mondo et al., 2010); no Brasil, podem ocorrer frequentemente nas principais culturas agrícolas (Kissmann e Groth, 1997), sendo que na citricultura Paulista o capim amargoso é encontrada como muita frequência infestando os pomares, exigindo medidas efetivas de controle (Melo et al., 2012).

Nos pomares de laranja a principal estratégia de manejo de plantas daninhas é o herbicida glyphosate, no início em aplicações de manejo para área total e depois em jato dirigido (Galli & Montezuma, 2005; Ferreira et al., 2010). É o herbicida com maior volume de vendas no mundo (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003), a sua utilização tem tido expressivos aumentos de vendas nos últimos

anos, principalmente com a adoção de culturas a ele resistentes e em pomares de frutíferas.

De acordo com Silva & Silva (2007), o manejo químico, por meio de herbicidas, é a tecnologia mais utilizada na agricultura, com pouco mais de meio século de uso. Apesar disto, alguns mecanismos de ação não controlam eficientemente algumas espécies de plantas daninhas, que originalmente eram controladas, devido a seleção de biótipos que eram pouco frequentes na população original (Christoffoleti et al., 1994). A resistência das plantas daninhas aos herbicidas é a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a doses de certo herbicida que seriam letais a indivíduos suscetíveis da mesma espécie (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008). Portanto, o herbicida passa a atuar como agente selecionador de indivíduos resistentes que se encontram em baixa frequência inicial (Christoffoleti et al., 1994).

Segundo Christoffoleti & López Ovejero (2003), a adaptabilidade ecológica do biótipo resistente e suscetível indica que ocupam nichos ecológicos semelhantes e dessa forma, uma vez estabelecida a população resistente, naturalmente ela não retorna para a frequência original de suscetibilidade. Dessa forma, a resistência do capim-amargoso ao glyphosate assume grande importância. Portanto, diagnosticar a presença de biótipos de

capim-amargoso resistentes ao glyphosate em uma população de plantas daninhas de forma rápida, eficaz e precisa ajuda a prevenir a disseminação de sementes resistentes na área, evitando problemas futuros. Nesse sentido, desenvolveu-se a presente pesquisa com o objetivo de quantificar o fator de resistência entre os biótipos de *Digitaria insularis* suscetível e resistente ao glyphosate, por meio de experimentos em casa de vegetação.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido em casa-de-vegetação, durante os meses de fevereiro a maio de 2012. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2 x 6, 2 biótipos e 6 tratamentos, e 4 repetições. A unidade experimental foi representada por um vaso plástico de capacidade para 3,0 L, preenchido com substrato comercial PlantMax-hortaliças (análise de solo indicou a composição de 285,28 mg kg⁻¹ de P; 0,48 cmolC dm⁻³ de K⁺, 2,7 cmolC dm⁻³ de Ca e 6,8 cmolC dm⁻³ de Mg (análise realizada pelo departamento de Solos de Nutrição da ESALQ-USP). Foram semeados os biótipos nestes vasos em quantidade de sementes que proporcionou a germinação de mais plantas que o necessário. Assim, depois de 20 dias da semeadura foi feito um desbaste, deixando-se quatro plantas por vaso.

As aplicações dos tratamentos herbicidas foram realizadas quando as plantas possuíam de 3 a 4 perfilhos. Para aplicação dos tratamentos herbicidas foi utilizado um pulverizador costal manual, trabalhando à pressão constante de 2,0 bar, pressurizado por CO₂, utilizando duas pontas descritas como bicos do tipo leque XR 110.02, espaçados a 0,5 m, aplicando um volume de calda correspondente a 300 L ha⁻¹.

Para cada população, os tratamentos herbicidas foram constituídos de cinco doses de glyphosate, com base na dose recomendada, utilizando uma formulação comercial contendo

360 g L⁻¹ (2,5 L de produto comercial ha⁻¹ ou 900 g e.a. ha⁻¹), sendo esta dose chamada de D, assim os tratamentos foram: ½ D, 1D, 2D, 4D e 8D, e ainda o tratamento controle, sem aplicação do herbicida. Sendo assim, os tratamentos em g e.a. ha⁻¹ de glyphosate foram 0, 450, 900, 1.800, 3.600 e 7.200, respectivamente.

Após a aplicação dos tratamentos foi realizada a avaliação de controle visual aos 14 dias após o tratamento, por meio de escala percentual de notas, em que zero corresponde a nenhuma injúria na planta e 100, à morte das plantas, conforme a metodologia proposta pela Associação Latinoamericana de Malezas - ALAM (1974). Em seguida coletaram-se a parte aérea das plantas, que foram colocadas em estufa de circulação forçada por 72 horas a temperatura constante de 60°C, até massa constante, e após secagem total das plantas avaliou-se a biomassa seca.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à aplicação do teste F na análise da variância. Sendo significativo o teste F, foram construídas as curvas de dose-resposta, e os dados foram ajustados ao modelo de regressão não-linear do tipo log-logístico proposto por Knezevic et al. (2007), representado na seguinte equação (Equação 1):

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

Em que y é a porcentagem de controle, x é a dose do herbicida (g e.a. ha⁻¹); e “b”, “d” e “e” são parâmetros da curva, de modo que “b” é a declividade da curva, “d” é o limite superior da curva, e “e” é a dose que proporciona 50% de resposta da variável. O limite inferior da curva foi considerado como zero.

As doses de herbicidas utilizadas para alcançar os níveis de controle de 50, 80 e 95% dos biótipos R e S de capim amargoso foram calculadas por meio do programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

Resultados e Discussão

A análise de variância dos dados revelaram diferenças estatisticamente significativas nas porcentagem de controle entre os dois biótipos estudados, confirmando assim a resistência na população R coletada no município de Matão. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Carvalho, 2011; Melo, 2012), que usaram populações provenientes do mesmo local coletado para este ensaio, porém estes autores encontraram diferenças menores das observadas neste trabalho.

Os parâmetros “b”, “d” e “e” que originaram às curvas de dose-resposta foram estimados para os dois biótipos estudados, aplicando-se a análise de regressão não linear e utilizando a equação proposta por Knezevic et al. (2007) (Tabela 1). Observando o valor de *e* nesta tabela (dose que proporciona 50% de

resposta da variável) verifica-se que para o biótipo S o desvio padrão foi elevado em valores relativos a média, indicando a variabilidade de resultados foi grande, porém não há dúvidas de que o biótipo resistente apresentou valores significativamente maiores, em doses de glyphosate, que o biótipo suscetível, reforçando a conclusão da resistência do biótipo R. Os valores similares de *b* (declividade da curva) indicam que as curvas eram paralelas entre si, indicando que a resposta ao herbicida é de padrão similar para os biótipos, porém em diferentes intensidades (Ritz et al. 2006). Avaliando os valores de *d* observa-se que as curvas atingiram valores próximos de 100% para os dois biótipos, evidenciado que a amplitude de doses utilizadas no ensaio foi adequada (Streibig, 1988).

Tabela 1. Parâmetros estimados para as curvas de dose-resposta dos biótipos resistente e suscetível de capim amargoso, no estágio de 3 a 4 perfilhos (SE = desvio padrão). Piracicaba, SP, 2012.

Estimativas de parâmetros baseados na regressão não Linear				
		b ± SE	d ± SE	e ± SE
% Controle (C)	Resistente	1,96 ± 0,27	91,66 ± 5,53	1732,26 ± 181,70
	Suscetível	1,25 ± 1,30	100,89 ± 3,78	85,49 ± 139,27
		b ± SE	d ± SE	e ± SE
Biomassa Seca (GR)	Resistente	1,85 ± 0,36	103,07 ± 5,54	1811,18 ± 218,62
	Suscetível	1,50 ± 1,75	99,99 ± 6,49	108,70 ± 202,23

“b” representa a declividade da curva, “d” é o limite superior da curva e “e” é a dose que proporciona 50% de resposta da variável.

O fator R/S corresponde à divisão do C50, C80 e C95 do biótipo R pelos mesmos valores correspondentes ao biótipo S (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008). A resistência é confirmada quando o fator R/S é significativamente maior que 1,0 (Saari et al., 1994). Os valores encontrados para fator de resistência (FR) para três níveis de controle calculados (50, 80 e 95%) nos parâmetros controle (C) e massa seca (GR) atingiram valores mínimo de 8,74 até 20,26, confirmando a resistência da população (Tabela 2). Os

fatores de resistência encontrados para o capim-amargoso, comparando-se o biótipo resistente e suscetível ao glyphosate foram bem superiores aos mesmos resultados encontrados por Carvalho (2011) e Melo (2012). Estes resultados permitem concluir que os biótipos estudados têm um alto grau de resistência, maior que os já relatados na literatura, que estão em dimensões menores que 10. Alto grau de resistência pode indicar que os mecanismos de resistência ao glyphosate nesta planta daninha são resultantes de alteração no sítio de

ação e não no metabolismo, como geralmente ocorrem em plantas daninhas com baixos valores do fator R/S. Para determinação destes mecanismos há necessidade de novos estudos. Também é possível concluir a partir deste ensaio que o manejo desta planta daninha deve

estar fundamentado em herbicidas alternativos, pois incrementos na dose de glyphosate provavelmente não é viável economicamente, baseado nas doses de controle apontadas na curva de dose-resposta do biótipo resistente.

Tabela 2. Doses de glyphosate (g e.a. ha⁻¹) necessárias para promover o controle (C) ou reduzir a massa seca (GR) 50, 80 e 95% da espécie *Digitaria insularis* dos biótipos resistente e suscetível. Piracicaba, SP, 2012

Biótipo	Controle visual (C)			Massa Seca (GR)		
	50%	80%	95%	50%	80%	95%
Resistente (R)	1732,26	3507,56	7751,37	1811,20	3824,12	8857,99
Suscetível (S)	85,49	257,13	886,49	108,70	273,81	773,41
FR (R/S) ¹	20,26	13,64	8,74	16,66	13,96	11,45

¹ Fator de resistência obtido a partir da divisão do valor do biótipo R pelo biótipo S.

A partir dos parâmetros em que foram calculadas as doses de glyphosate necessárias para proporcionar o controle de 50, 80 e 95% da espécie *Digitaria insularis*, foram geradas

duas curvas de dose-resposta por meio da variável controle (%) obtida pelo herbicida glyphosate aos 14 dias após a aplicação, para os biótipos resistente e suscetível (Figura 1).

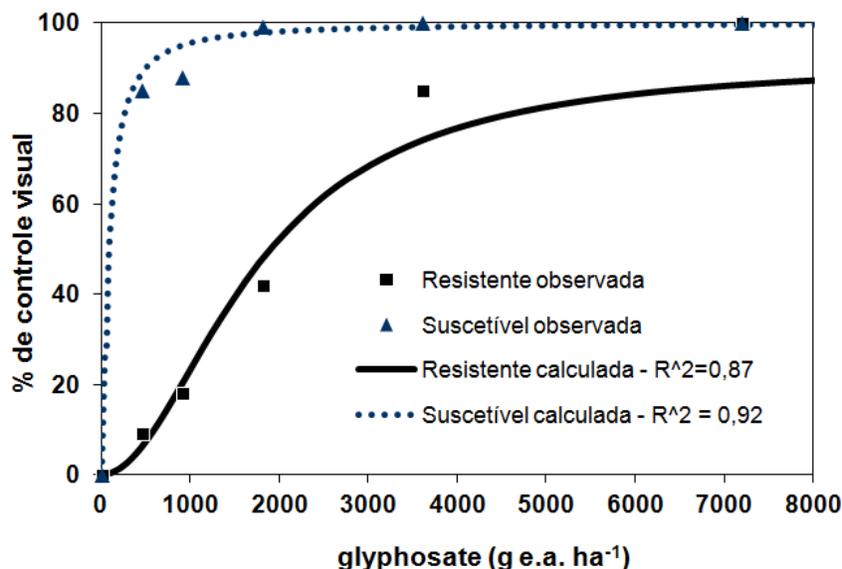


Figura 1. Curva de dose-resposta para a avaliação visual da porcentagem de controle (C) dos biótipos suscetível (S) resistente (R), 14 dias após a aplicação do herbicida de glyphosate. Piracicaba, SP, 2012

Pela análise da Figura 1, verifica-se que a população suscetível é controlada em mais de 85% na dose normalmente recomendada para capim-amargoso, que oscila entre 540 e 1.440

g e.a. ha⁻¹ (Rodrigues e Almeida, 2011). Por sua vez, para os biótipos resistentes, observa-se um comportamento distinto, sendo que os

mesmos não atingiram 80% de controle para a maior dose utilizada, 7.200 g e.a. ha⁻¹.

A partir dos parâmetros em que foram calculadas as doses de glyphosate necessárias para proporcionar o GR 50, 80 e 95% do capim amargoso, foram geradas duas curvas de dose-

resposta por meio da variável redução percentual da biomassa seca (GR) obtida pelo herbicida glyphosate aos 14 dias após a aplicação, para os biótipos resistente e suscetível, e estão representadas na Figura 2.

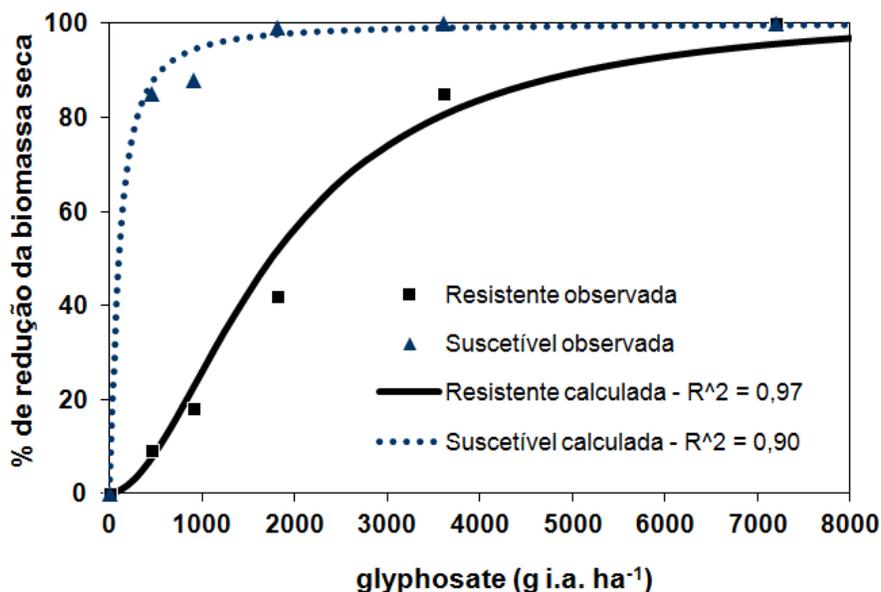


Figura 2. Curva de dose-resposta para a avaliação da porcentagem de redução de biomassa seca (GR) em gramas, por planta, dos biótipos suscetível (S) e resistente (R), 14 dias após a aplicação do herbicida glyphosate. Piracicaba, SP, 2012

A biomassa seca foi reduzida com o aumento da concentração do herbicida aplicado, contudo observou-se resposta distinta entre os dois biótipos estudados (Figura 2). Resultados apresentados por Carvalho (2011) e Melo (2011) foram plotados na forma de valores de biomassa e não de porcentagem de redução em relação ao controle (dose 0.0 e.a. ha⁻¹), no entanto, apresentam a mesma tendência de redução da biomassa, ou seja o biótipo resistente necessitou de doses muito acima da recomendada para proporcionar reduções significativas da biomassa. A dose recomendada de 900 g e.a. ha⁻¹ foi responsável pela redução de cerca de 90% da biomassa seca do biótipo suscetível e apenas 20% do biótipo resistente.

A partir dos resultados constata-se indícios da presença de biótipos resistentes de

capim-amargoso ao herbicida glyphosate na região de Matão, uma vez que a dose recomendada (900 g e.a. ha⁻¹) não controla os biótipos. Além disso, observa-se expressivo aumento de dose para os demais níveis de controle avaliados quando comparados aos mesmos níveis para os biótipos suscetíveis. Esta informação é muito importante para os sistemas de manejo, pois indica a necessidade de que sejam utilizados herbicidas alternativos, com outros mecanismos de ação para o controle desta planta daninha. Também, os elevados índices de resistência observado para este biótipo indica que os mecanismos de resistência ao glyphosate devem ser decorrentes de alteração no sítio de ação ou por super expressão gênica, pois mecanismos como o metabolismo não proporcionam fatores de resistência tão alto quanto encontrado neste

trabalho. Sendo assim, fica evidente a necessidade de novos estudos para elucidar os mecanismos de resistência deste biótipo.

Conclusões

A aplicação das doses de glyphosate sobre as populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) nos estádios de 3 a 4 perfilhos indicaram diferenças significativas entre os biótipos, confirmando a resistência na população coletada no município de Matão em níveis elevados. Estes níveis de resistência evidenciam a necessidade de medidas racionais alternativas de controle, principalmente baseada em herbicidas de mecanismos de ação diferenciados e também indicam a necessidade de novos estudos para elucidar os mecanismos de resistência ao glyphosate neste biótipo.

Referências

ASOCIATION LATINOAMERICANA DE MALEZAS - ALAM. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v.1, p.35-38, 1974.

CANTO-DOROW, T.S. *Digitaria Heister* ex Haller. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, 2001. p.143-150.

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.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.21, n.3, p.507-515, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de**

plantas daninhas a herbicidas. 3. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. p.9-32.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

FERREIRA, L.R. et al. **Manejo integrado de plantas daninhas na cultura do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV.2010. 140 p.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos do herbicida glifosato na agricultura**. Santo André: Editora ACADCOM, Publicação Monsanto do Brasil. 2005. 66 p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1997. t. 1: Plantas inferiores e monocotiledôneas, 825 p.

KNEZEVIC, S.Z.; STREIBIG, J.C.; RITZ, C. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. **Weed Technology**, v.21, n.3, p.840-848, 2007.

MELO, M.S.C.; ROSA, L.E.; BRUNHARO, C.A.C.G.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas para o controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.11, n.2, p.195-203, 2012.

MONDO, V.H.V. et al. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.131-137, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 19 jul. 2013.

RITZ, C.; CEDERGREEN, N; JENSEN, J.E.; STREIBIG, J.C. Relative potency in nonsimilar dose-response curves. **Weed Science**, n.54, v.3, p.407-412. 2006.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6. ed. Londrina, 2011. 697 p.

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; THILL, D.C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.353.

SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 367 p.

STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v.28, n.3, p.479-484, 1988.