

**Infestantes dos arrozais: contributo para o estudo da germinação de *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* e da sensibilidade a herbicidas em *Cyperus difformis***

**João Pedro Carvalho Santos**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica - especialização em Proteção de Plantas**

Orientadores: Doutora Francisca Constança Frutuoso de Aguiar  
Doutora Isabel Maria da Silva Monteiro Miranda Calha

**Júri:**

Presidente: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria do Rosário Conceição Cameira, Professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Isabel Maria da Silva Monteiro Miranda Calha, Investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

## **Agradecimentos**

À Doutora Isabel Calha, pela disponibilidade total para me ajudar, em todos os momentos, na realização deste trabalho. Pelos ensinamentos e referências que me transmitiu. Hoje compreendo melhor o mundo vegetal, pela forma interessada e entusiasmada como vê e trabalha com as plantas. A constante troca de ideias melhorou a minha perspetiva agronómica, aumentando o horizonte do meu pensamento e condicionando positivamente o meu trabalho. Um bem-haja.

À Professora Doutora Francisca Aguiar, por ter aceitado a orientação deste trabalho. O grau de exigência e qualidade que conferiu na orientação deste trabalho, valorizando sempre o meu esforço e dedicação. Porque um bom professor é aquele que leva o aluno a superar-se, efetivamente considero-a uma excelente professora.

À Engenheira Teresa Vasconcelos, continuadora de uma linhagem de botânicos de excelência que passaram por este Instituto, por me ter aberto as portas do Herbário “João de Carvalho e Vasconcellos” e por toda sabedoria e informações que me transmitiu.

À Engenheira Teresa Pereira (Vomar) e ao Engenheiro Gonçalo Canha (Lusosem) pela disponibilidade imediata de nos acompanharem ao campo e fornecerem todas as informações sobre os mesmos, ao mesmo tempo que mostraram entusiasmo pelo contributo deste trabalho para todo o setor orizícola.

Ao colega Danny Carvalheiro por me ter feito chegar a amostragem do campo do Mondego, de modo a este trabalho ser mais representativo a nível nacional.

À Antónia Ferreira, a quem devo tantas horas de incansável ajuda e sugestões para este trabalho e para a minha vida. É a prova de que os colegas se podem tornar amigos e nunca esquecerei todo o suporte que me deu, o qual só posso retribuir com a minha sincera amizade.

Ao Rafael Ferreira, pela força e motivação que me deu e continua a dar para enfrentar tantos desafios, nomeadamente esta dissertação, onde as suas capacidades intelectuais e espirituais me capacitaram a não desistir. Um bem-haja por existirem pessoas como ele.

Aos colegas Paulo Alexandre, André Marçal, Diogo Lucas, Tatiana Gil, João Pinheiro e tantos outros com quem partilhei a minha experiência no ISA-UL, eles, juntamente com todos os já referidos, são a prova que o setor agrícola em Portugal está bem entregue.

Aos meus amigos Inês, Jéssica, Guilherme e Duarte, que ao ouvirem os meus lamentos nunca se cansaram e mantiveram-me focado e disponível para, num ano adverso para todos, não perder o rumo do meu percurso académico.

Por último, porque os últimos são os primeiros, quero agradecer à minha família, em particular à minha mãe, por tudo o que tem sacrificado por mim, pelos valores que me passou e que tento aplicar todos os dias.

## Resumo

O arroz é um dos cereais com maior área de cultivo e maior consumo no mundo e em Portugal. As infestantes são o principal problema fitossanitário desta cultura, devido à dificuldade na gestão de infestações, por aspetos relacionados com a sua biologia e com a ocorrência de resistência a herbicidas.

*Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* (erva-fina ou leptocloa) é uma gramínea anual semiaquática, norte-americana, considerada uma infestante emergente do arroz em Portugal. *Cyperus difformis* (negrinha) é uma ciperácea anual, causando elevados prejuízos na maioria das regiões orizícolas mundiais e em Portugal. Há suspeitas de populações resistentes a herbicidas de ambas as espécies em arrozais portugueses.

Este trabalho teve como primeiro objetivo eleger o tratamento mais eficaz de quebra de dormência das sementes de leptocloa, devido à grande dificuldade na obtenção de plantas para ensaios de resistência devido a fenómenos de dormência. Realizaram-se ensaios de germinação de sementes colhidas na campanha de 2020 e provenientes de várias populações de arroz do Baixo Mondego, Ribatejo e Alentejo. Foram testados 24 tratamentos. Um segundo objetivo focou-se na resistência de uma população de *C. difformis*, proveniente de um arrozal do Alentejo, com o objetivo de validar suspeitas de resistência às substâncias ativas bentazona (inibidor da fotossíntese no fotossistema II) e ao penoxsulame (inibidor da enzima acetolactato sintase), através de testes rápidos de despiste.

Os ensaios de quebra de dormência em leptocloa evidenciaram que o tratamento misto de estratificação húmida a 3 °C, na obscuridade, seguido de punção é o mais eficaz para as várias populações. Este resultado indica uma possível dormência combinada, fisiológica e física. Os ensaios na população de negrinha evidenciaram resistência às substâncias ativas estudadas, mas será aconselhável a validação em vaso com planta inteira em condições de campo. Estes trabalhos representam um importante contributo para estudos de resistência, necessitando de continuidade para aperfeiçoamento e validação.

Palavras-chave: leptocloa, negrinha, dormência, resistência, bentazona

## Abstract

Rice is amongst the cereals with the largest cultivated area and the highest consumption in the world and Portugal. Weeds are the main phytosanitary problem of this crop, given the difficulty in weed management due to aspects related to its biology and the occurrence of herbicide resistance.

*Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* (bearded sprangletop) is a north American semi-aquatic annual grass, considered an emerging rice weed in Portugal. *Cyperus difformis* (smallflower umbrella sedge), is an annual cyperaceous plant, that causes major losses in most rice regions worldwide, including in Portugal. There are suspicions of herbicide-resistant populations of both species in Portuguese rice fields.

This work had a first objective of selecting the more effective method for breaking dormancy of bearded sprangletop seeds, given the great difficulty in obtaining plants for dose-response bioassays due to the dormancy phenomena. Tests of seeds' germination were done using seeds collected during the 2020 campaign from various populations of Baixo Mondego, Ribatejo, and Alentejo. Twenty-four treatments were tested for dormancy breaking. A second case study was focused on the resistance of a *C. difformis* population, from a rice field in Alentejo, to validate the suspicions on resistance to the active ingredients bentazone (photosystem II inhibitor) and penoxsulam (acetolactate synthase inhibitor), through screening tests.

Dormancy breaking tests on bearded sprangletop showed that the most effective method for all populations was the mixed treatment of wet stratification at 3 °C, in the dark, followed by puncturing. This result indicates a possible combined dormancy, that is, physiological and physical. Tests on the smallflower umbrella sedge population showed resistance to the active ingredients studied, but validation in pots with whole plants under field conditions is advisable. These studies represent an important contribution to herbicide resistance studies, needing to be continued for improvement and validation.

Key-words: bearded sprangletop, smallflower umbrella sedge, dormancy, resistance, bentazone

## Conteúdo

Agradecimentos.....	I
Resumo .....	III
Abstract.....	IV
Índice de figuras .....	VII
Índice de quadros .....	X
Lista de acrónimos e siglas .....	XI
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Estado da Arte .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 A cultura do arroz.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Infestantes do arroz.....</b>	<b>4</b>
2.2.1 <i>Leptochloa fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> .....	4
2.2.2 <i>Cyperus difformis</i> .....	7
<b>2.3 Gestão de infestantes .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Resistência adquirida aos herbicidas .....</b>	<b>9</b>
2.4.1 Situação mundial.....	10
2.4.2 Métodos de deteção.....	12
<b>2.5 Germinação e dormência.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Ensaio de germinação de <i>Leptochloa fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i>.....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Material vegetal.....	18
3.1.2 Desinfecção das sementes .....	19
3.1.3 Tratamentos para quebra de dormência.....	19
3.1.4 Curvas de germinação .....	24
3.1.5 Análise estatística .....	24
<b>3.2 Ensaio de confirmação de resistência em <i>Cyperus difformis</i>.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Material vegetal.....	26
3.2.2 Ensaio de sensibilidade a herbicidas .....	27
3.2.3 Análise estatística .....	29
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Ensaio de germinação de <i>Leptochloa fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i>.....</b>	<b>30</b>

4.1.1	Desinfecção das sementes .....	30
4.1.2	Tratamentos para quebra de dormência.....	30
4.1.3	Curvas de germinação .....	37
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de confirmação de resistência em <i>Cyperus difformis</i>.....</b>	<b>41</b>
4.2.1	Ensaio de avaliação de resistência à bentazona .....	41
4.2.2	Ensaio de avaliação de resistência ao penoxsulame.....	44
<b>5.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>A</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Distribuição da espécie <i>Leptochloa fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> na Península Ibérica: A – Primeiros registos da espécie <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> , por região e ano, em Espanha. <sup>1</sup> (Llenes <i>et al.</i> , 2020); <sup>2</sup> (Devesa <i>et al.</i> , 1991); <sup>3</sup> (Márquez, 1999); <sup>4</sup> (Bozal <i>et al.</i> , 2011); <sup>5</sup> (Monte & Cortéz, 2000); <sup>6</sup> (Gullón & Rubio-García, 1999); <sup>7</sup> (Oscá, 2013). B – Exsicata mais antiga de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> do Herbário João de Carvalho e Vasconcellos (LISI), datada de julho de 2004, colhida em arrozal de Benavente (original de João Santos).....	5
Figura 2. Cariopses de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> , com pormenor das lemas, tamanho da semente e localização do embrião (adaptado de Walters & Southwick, 2018).....	6
Figura 3. Infestação de <i>Cyperus difformis</i> em campo de arroz (original de Isabel Calha). .....	7
Figura 4. Fatores que influenciam a evolução da resistência a herbicidas em populações de infestantes (adaptado de Powles & Yu, 2010).....	9
Figura 5. Representação da variação hormonal (ABA – ácido abscísico e GA <sub>3</sub> – ácido giberélico) e do conteúdo de água na semente, durante as fases do processo de germinação (adaptado de Daszkowska-Golec, 2011 e Pastor, 2018). ....	14
Figura 6. Distribuição das parcelas (campos de arroz) onde se fez a amostragem de plantas e recolha de sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> em 2020, nas três principais regiões orizícolas portuguesas.....	18
Figura 7. Panorama da infestação no campo R07_20 à data da colheita de sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> (original de Isabel Calha). ....	19
Figura 8. Pormenor da realização de punção às sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> , à lupa binocular (ampliação 20x) (original de João Santos).....	21
Figura 9. Sequência laboratorial do tratamento de estratificação por calor húmido de sementes [1 – imersão em água a 80 °C; 2 – gobelés colocados em estufa de incubação durante 5 min a 80 °C; 3 – desinfeção com agitação; 4 – colocação das sementes em placa de Petri com agar (1%); 5 – colocação em câmara de germinação a 23/18 °C, 16 h luz] (originais de João Santos). ....	22
Figura 10. Panorama geral (A) e pormenor (B) da infestação de <i>Cyperus difformis</i> no campo de arroz de Alcácer do Sal A12_20 (originais de João Santos). ....	26
Figura 11. Sequência laboratorial entre a colheita e a testagem de herbicidas a <i>C. difformis</i> em microplacas de cultura celular com agar (originais de João Santos). ....	27



Figura 12. Germinação das sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> da população R07_20 em câmara de crescimento (23/18 °C, 16 h luz), para todos os tratamentos realizados (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias de germinação entre tratamentos (teste de Duncan, p<0,05). .....	32
Figura 13. Rompimento do tegumento – A e saída da radícula – B (4 DAS) em sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> da população R07_20, sujeitas ao método físico misto de estratificação por frio húmido e punção, para quebra de dormência. Observação em lupa binocular (ampliação 20x) (originais de João Santos). .....	32
Figura 14. Sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> da população R07_20 após escarificação química com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> durante 120 s. Observação em lupa binocular (ampliação 20x) (original de João Santos). .....	33
Figura 15. Germinação média das sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> das populações M14_20 (BH Mondego) R03_20 (BH Tejo) e A11_20 (BH Sado) para os dois tratamentos comuns a todas as populações: estratificação por frio húmido durante 5 meses (16) e estratificação por frio húmido durante 5 meses com punção (2) (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média. As diferenças entre médias são significativas entre tratamentos, nas três populações (t de Student, p<0,05). .....	35
Figura 16. Germinação das sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> da população R09_20 com alternância de temperatura entre 23/18 °C (esq.) e 30/25 °C (dir.), 16 h de luz, para todos os tratamentos realizados (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias de germinação de sementes entre tratamentos (teste de Duncan, p<0,05). .....	36
Figura 17. Germinação média das sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> das populações R06_21 e R08_21, colhidas e semeadas no próprio dia, sem qualquer tratamento (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média. As diferenças entre médias são significativas entre as populações (t de Student; p<0,05). .....	37
Figura 18. Curvas de germinação estimadas pelo modelo Weibull com software estatístico R para as 11 populações que germinaram no tratamento 2 (R – Ribatejo).	39

Figura 19 (continuação). Curvas de germinação estimadas pelo modelo Weibull com software estatístico R para as 11 populações que germinaram no tratamento 2 (R – Ribatejo, A – Alentejo, M – Mondego).....	40
Figura 20. Efeito da bentazona numa população de <i>Cyperus difformis</i> (A12_20) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) – dir. e por observação visual – esq (n=12/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica, $p<0,05$ ) (original de João Santos). .....	42
Figura 21. Efeito da bentazona numa população de <i>Cyperus difformis</i> (R09_19) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração) Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica, $p<0,05$ ). 42	
Figura 22. Efeito da bentazona numa população de <i>Cyperus difformis</i> (A12_20) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica, $p<0,05$ ). .....	43
Figura 23. Efeito da bentazona em três populações de <i>Cyperus difformis</i> (A12_20 e R09_19 – esq., A07_19 e A12_20 – dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica, $p<0,05$ ).....	43
Figura 24. Efeito da bentazona em duas populações de <i>Cyperus difformis</i> (A10_19 e A12_20) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica, $p<0,05$ ).....	44
Figura 25. Efeito do penoxsulame em duas populações de <i>Cyperus difformis</i> (A07_19 - esq. e A10_19 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica, $p<0,05$ ).....	45

Figura 26. Efeito do penoxsulame em duas populações de *Cyperus difformis* (A07\_19 - esq. e A10\_19 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica,  $p < 0,05$ )..... 46

Figura 27. Efeito do penoxsulame em duas populações de *Cyperus difformis* (R09\_19 - esq. e A12\_20 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica,  $p < 0,05$ )..... 46

## Índice de quadros

Quadro 1. Características das sementes consoante cada classe de dormência .....	16
Quadro 2. Descrição de alguns tratamentos utilizados na quebra de dormência de sementes .....	17
Quadro 3. Breve descrição das modalidades de quebra de dormência utilizadas .....	20
Quadro 4. Caracterização dos dois herbicidas utilizados nos ensaios .....	27
Quadro 5. Ensaio de sensibilidade a herbicidas na espécie <i>Cyperus difformis</i> , realizados entre 2020 e 2021 .....	28
Quadro 6. Lista de tratamentos aplicados às de sementes de <i>L. fusca</i> subsp. <i>fascicularis</i> da população R07_20, com respetivos períodos de armazenamento em seco (T. A), a 3 °C na obscuridade, antes de cada tratamento .....	31

## Lista de acrónimos e siglas

AAR	Pós-maturação acelerada, sigla inglesa de <i>Accelerated After Ripening</i>
ABA	Ácido abcísico, sigla inglesa de <i>Abscisic Acid</i>
ACCase	Acetil-Coenzima A-carboxilase
ALS	Acetolactato Sintase
ANOVA	Análise de variância, sigla inglesa de <i>Analysis Of Variance</i>
BBCH	Sigla alemã de <i>Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische industrie</i>
BH	Bacia Hidrográfica
DAS	Dias Após Sementeira
DRAP	Direção Regional de Agricultura e Pescas
EC	Concentrado para emulsão, sigla inglesa de <i>Emulsifiable Concentrate</i>
EPSP <sub>s</sub>	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico, sigla inglesa de <i>Gibberellic Acid</i>
HRAC	Sigla inglesa de <i>Herbicide Resistance Action Committee</i>
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
LISI	Código internacional do Herbário João de Carvalho e Vasconcellos
MOA	Modo de Ação
NTSR	Resistência fora do local de ação, sigla inglesa de <i>Non-Target-Site Resistance</i>
OD	Dispersão em óleo, sigla inglesa de <i>Oil Dispersion</i>
p.c.	Produto comercial
PE	Polietileno
PEG	Polietilenoglicol
PMS	Peso de mil sementes
PSII	Fotossistema II, sigla inglesa de <i>Photosystem II</i>
RT	Temperatura ambiente, sigla inglesa de <i>Room Temperature</i>

s.a.	Substância ativa
SC	Suspensão concentrada, sigla inglesa de <i>Suspension Concentrate</i>
SL	Solução concentrada, sigla inglesa de <i>Soluble concentrate</i>
TSR	Resistência no local de ação, sigla inglesa de <i>Target-Site Resistance</i>
WG	Grânulos dispersíveis em água, sigla inglesa de <i>Water dispersible Granules</i>

# 1. Introdução

As previsões de crescimento da população mundial referem que se irá atingir ou ultrapassar o valor de 9 mil milhões de pessoas em 2050, o que representa um enorme esforço global para fornecer energia, água doce e alimentos suficientes para satisfazer as necessidades desta população (Westwood *et al.*, 2018). O arroz (*Oryza sativa* L.), conjuntamente com o milho (*Zea mays* L.) e o trigo (*Triticum* L. spp.) são os cereais mais consumidos a nível mundial. Em particular, estima-se que seja necessário um aumento de 26% e 50% na produção global de arroz até 2035 e 2050, respetivamente, e as plantas infestantes são consideradas a maior ameaça biótica para alcançar estes objetivos (Shekhawat *et al.*, 2020).

O paradigma dominante na gestão de infestantes dos países desenvolvidos é, atualmente, baseado em dois eixos principais: utilização de métodos químicos e mecânicos. Ambos têm impactos negativos crescentes, como a resistência aos herbicidas ou contaminação dos solos.

Estratégias sustentáveis na gestão do ecossistema agrícola são fundamentais para satisfazer a alimentação mundial, manter as paisagens, conservar o ambiente, os ecossistemas e a biodiversidade, dos quais dependemos (MacLaren *et al.*, 2020).

Atualmente na Europa aposta-se também em medidas indiretas, nomeadamente através do Pacto Ecológico Europeu, que preconiza a redução do uso de pesticidas em 50% até ao ano de 2030. Deste modo importa utilizar este recurso (químico) de forma eficaz e as resistências comprometem essa eficácia.

A utilização de herbicidas sem eficácia corresponde a contaminação ambiental e a existência de populações resistentes conduzem a uma escalada da utilização destes pesticidas, aumentando o risco de quase todos os herbicidas atualmente existentes estarem inutilizáveis até 2050 (Westwood *et al.*, 2018). Deste modo, os herbicidas continuarão a ser utilizados, embora talvez de uma forma limitada e, portanto, o seu estudo, a prospeção de resistências e a busca de alternativas são uma prioridade (Westwood *et al.*, 2018).

Na cultura do arroz, sendo frequentemente uma cultura alagada, o controlo mecânico de infestantes é dificultado e atualmente apresenta, depois do trigo e do milho, o maior número de casos registados de infestantes com resistências (Chauhan, 2020; Driver *et al.*, 2020a). Nos arrozais portugueses estão identificados 68 táxones de infestantes, dos quais os que causam prejuízos significativos pertencem às famílias botânicas Poaceae, Alismataceae e Cyperaceae (Vasconcelos *et al.*, 2020).

Nos últimos 20 anos a pressão de infestantes como a negrinha (*Cyperus difformis* L.) ou a erva-fina ou leptocloa (*Leptochloa* spp.) tem aumentado, sobretudo na região do vale do Tejo, mas também nos vales do Sado e Mondego (Canha, 2012). Estas espécies surgem assim, como uma “novidade”, não em termos de aparecimento, mas importância emergente no panorama nacional.

Neste trabalho é feito um enquadramento sobre a cultura do arroz e a sua importância agrícola. Aborda-se a gestão de infestantes desta cultura de uma forma integrada, com particular incidência no uso de métodos químicos, prática ainda generalizada nesta cultura e da problemática crescente de resistências a diversas substâncias ativas e modos de ação, devido a resistências cruzadas.

Esta dissertação tem como objetivo contribuir para a prospeção de resistência a herbicidas em populações de infestantes de arrozais portugueses. Estudaram-se duas espécies infestantes: a infestante exótica emergente *Leptochloa fusca* (L.) Kunth. subsp. *fascicularis* (Lam.) N.Snow (Poaceae) e a infestante nativa *Cyperus difformis* L. (Cyperaceae).

Um primeiro caso de estudo focou-se na obtenção de plantas de *L. fusca* subsp. *fascicularis* para investigação de resistências, através de germinação de sementes frescas provenientes de várias populações de arroz do Baixo Mondego, Ribatejo e Alentejo. Foram testados diferentes métodos para quebra de dormência, uma vez que há uma grande dificuldade na obtenção de plantas para ensaios devido a fenómenos de dormência. Um segundo caso de estudo dedicou-se ao estudo da resistência de populações de *C. difformis* de arrozais da bacia hidrográfica do Sado à bentazona e ao penoxsulame.

## 2. Estado da Arte

### 2.1 A cultura do arroz

O arroz, *Oryza sativa* L., é uma espécie da família Poaceae com uma antiguidade entre 15 000 e 8 000 anos e origem no sudeste asiático, sendo descendente do arroz selvagem – *O. rufipogon* Griff (Vianna e Silva, 1969; Arcieri & Ghinassi, 2020).

*Oryza sativa* em conjunto com *O. glaberrima* Steur, são as duas espécies domesticadas e comestíveis deste género botânico, a primeira de origem asiática e a segunda de origem africana. A espécie asiática é dividida em dois tipos: *japonica* (carolino) e *indica* (agulha), ambos produzidos na Europa (Sweeney & McCouch, 2007).

O arroz é um dos cereais com maior área de cultivo e maior consumo no mundo, a par do trigo e do milho. Apesar de não ser considerado um alimento fundamental na Europa, tem importância sociocultural em diversos países, sobretudo mediterrânicos (Pinto, 2015)

Em Portugal, pensa-se que esta cultura tenha sido introduzida durante o domínio islâmico no século VIII, no entanto, os primeiros registos conhecidos são do século XIV e só no século XIX ganha expressão económica, através da mecanização, sobretudo nos campos do vale do Mondego (Teles, 1800; Vasconcellos, 1953; Vianna e Silva, 1969, Vaquinhas, 1991; Silva & Faísca, 2015).

Portugal é o quarto maior produtor de arroz europeu, depois de Itália, Espanha e Grécia, sendo responsável por 6-7% da sua produção. Apesar de apresentar uma tendência decrescente de produção ao longo dos últimos anos (185 000 t em 2015 e 153 000 t em 2019), apresenta o maior consumo *per capita* (15-17 kg.ano<sup>-1</sup>) da Europa (Oliveira *et al.* 2019; GPP, 2019). A sua produção está maioritariamente concentrada nos vales do Tejo – 50%, Sado – 29% e Mondego – 21% (Lima, 1997; GPP, 2019; INE, 2021).

Há preferência para o arroz do tipo carolino, ao contrário de Espanha, por exemplo, onde a produção é maioritariamente do tipo agulha (GPP, 2019; Caton, 2020). A importância da cultura revela-se também no desenvolvimento de atividades anuais de melhoramento genético que visam a criação de novas variedades de arroz, no âmbito do Programa Nacional de Melhoramento Genético do Arroz, coordenado pelo INIAV e desenvolvido em parceria com o Centro de Competências do Arroz – COTARROZ e a DRAP Centro (Almeida *et al.*, 2021).



## 2.2 Infestantes do arroz

As infestantes são o principal problema fitossanitário na cultura do arroz, devido à competição por nutrientes, água, luz e espaço. A presença de flora espontânea também pode aumentar a incidência de doenças e pragas que, em conjunto, levam a diferentes graus de redução da qualidade e de prejuízo na cultura. Estes podem variar entre 10 e 80% consoante as espécies, diversidade e densidade das infestantes e da ocorrência de resistência a herbicidas (Smith, 1988; Wang *et al.*, 2018; Hakim *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2021).

As principais infestantes da cultura do arroz em Portugal, à semelhança de outros países, pertencem às seguintes famílias (Kraehmer *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2020):

- Poaceae – *Oryza* spp., *Leersia* spp., *Echinochloa* spp. e *Leptochloa* spp., com uma grande semelhança fisiológica com o arroz (necessidades em nutrientes, períodos de crescimento), e por essa razão, muito competitivas;
- Cyperaceae – *Schoenoplectus* spp., *Cyperus* spp. e *Scirpus* spp., infestantes com modos de reprodução vegetativa, de difícil controlo;
- Outras: Alismataceae – ex. *Alisma* spp.; Lythraceae – ex. *Ammannia coccinea* Rottb.; Pontederiaceae – ex. *Heteranthera* spp.; Lemnaceae – ex. *Lemna minor* L.

Neste capítulo as espécies *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* e *C. difformis* são referidas com maior pormenor por incidir sobre elas o trabalho experimental.

### 2.2.1 *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis*

O género *Leptochloa* (Poaceae) inclui cerca de 32 espécies anuais e vivazes distribuídas por regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas, sendo referida como uma infestante com importância no arroz desde o início do século XX em todo o Mundo (McIntyre *et al.*, 1989; Snow *et al.*, 2018). Recentemente ganhou maior expressão na Europa, com a introdução da sementeira direta em seco ou húmida, particularmente devido às espécies *L. chinensis* (L.) Nees e *L. fusca* subsp. *fascicularis* (Suveges *et al.*, 2021). A introdução de espécies exóticas deve-se, com frequência, à contaminação das sementes (Macías *et al.*, 2011).

A espécie *L. fusca* (L.) Kunth contém quatro sub-espécies, com diferentes origens geográficas: *L. fusca* subsp. *muelleri* (Benth.) N.Snow (endémica da Austrália), *L. fusca* subsp. *fusca* (África, Sul da Ásia e Austrália), *L. fusca* subsp. *fascicularis* e *L. fusca* subsp. *uninervia* (J.Presl) P.M.Peterson & N.Snow (América do Norte) (Snow *et al.*, 2018).

Segundo a World Checklist of Vascular Plants (WCVP, 2021) o nome aceite é *Diplachne fusca* (L.) P.Beauv. ex Roem. & Schult. subsp. *fascicularis* (Lam.) P.M.Peterson & N.Snow. No entanto, vulgarizou-se o uso do sinónimo *Leptochloa fusca* (L.) Kunth subsp. *fascicularis* (Lam.) N. Snow em várias publicações recentes (e.g. Vasconcelos *et al.*, 2020) pelo que neste trabalho seguir-se-á esta nomenclatura. O código EPPO desta espécie é LEFFA, e o nome vernáculo em português é leptocloa ou erva-fina (Vasconcelos *et al.*, 2020; EPPO, 2021).

Em Espanha foi detetada nos anos 80-90 do século XX e generalizou-se a todas as regiões arroseiras a partir do ano 2000 (Figura 1 A), com maior incidência na Extremadura e Valência (Osca, 2013; Recasens *et al.*, 2020).

Em Portugal, Vasconcelos *et al.* (1999) e Vasconcelos & Forte (1999) ainda não referem a presença nos Vales do Tejo e do Sado e o primeiro exemplar de referência data de 2004, na zona do Ribatejo (Figura 1 B). A sua importância económica tem aumentado de uma “infestação média” no Vale do Tejo (Oliveira, 2016) para “infestação muito importante” a nível nacional. A subespécie *L. fusca* subsp. *uninervia*, ainda não foi referenciada nos arrozais portugueses (Vasconcelos *et al.*, 2020).

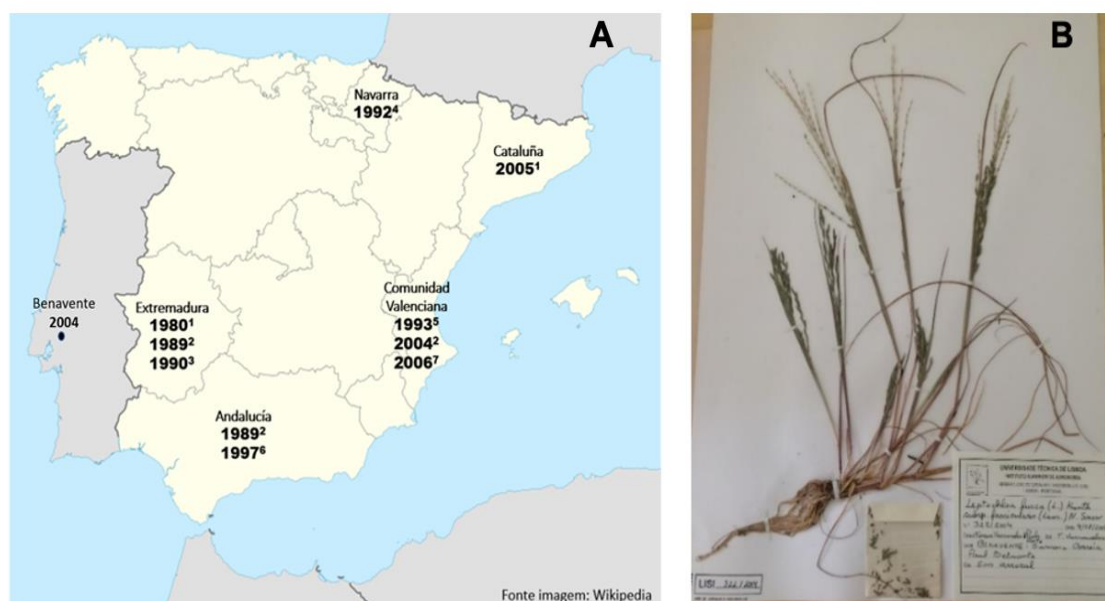


Figura 1. Distribuição da espécie *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* na Península Ibérica: A – Primeiros registos da espécie *L. fusca* subsp. *fascicularis*, por região e ano, em Espanha.<sup>1</sup>(Llenes *et al.*, 2020); <sup>2</sup>(Devesa *et al.*, 1991); <sup>3</sup>(Márquez, 1999); <sup>4</sup>(Bozal *et al.*, 2011); <sup>5</sup>(Monte & Cortéz, 2000); <sup>6</sup>(Gullón & Rubio-García, 1999); <sup>7</sup>(Osca, 2013). B – Exsicata mais antiga de *L. fusca* subsp. *fascicularis* do Herbário João de Carvalho e Vasconcellos (LISI), datada de julho de 2004, colhida em arrozal de Benavente (original de João Santos).

### 2.2.1.1 Bioecologia

*L. fusca* subsp. *fascicularis* é uma planta anual semi-aquática, halófito de regiões temperadas (Suveges *et al.*, 2021). Tem um mecanismo fotossintético C4, prefere sistemas de sementeira em seco ou com baixos níveis de água, solos de pH neutro, mas consegue suportar solos saturados e germinar em condições de anoxia (Altop *et al.*, 2015; Snow *et al.*, 2018, Driver *et al.*, 2020a).

O fruto é uma cariopse, neste caso oval e glabra, de cor castanha-parda, com 1,5 – 2,5 mm (Figura 2). As cariopses apresentam estruturas de proteção que a envolvem – a pálea, mais interna e a lema, mais externa. Estas estruturas são agudo-acuminadas, com uma pequena arista mais destacada em *L. fusca* subsp. *fascicularis* do que em *L. fusca* subsp. *uninervia* (Devesa *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2020).

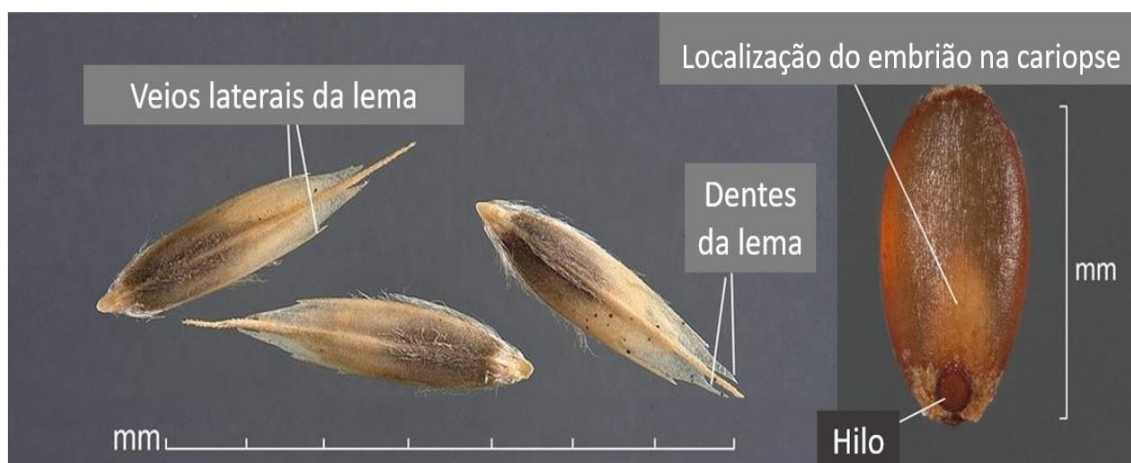


Figura 2. Cariopses de *L. fusca* subsp. *fascicularis*, com pormenor das lemas, tamanho da semente e localização do embrião (adaptado de Walters & Southwick, 2018).

Produz grandes quantidades de sementes (reprodução exclusivamente seminal) de forma escalonada – 48 000 sementes.m<sup>-2</sup> (0-6 cm de profundidade) em 18 meses (McIntyre *et al.*, 1989), formando banco de sementes persistente.

*Leptochloa fusca* germina melhor a 31/24 °C (Baskin *et al.*, 1999) e à superfície do solo não havendo emergências a profundidades superiores a 10 mm (McIntyre *et al.*, 1989).

Uma lâmina de água superior a 20 cm controla a sub-espécie *L. fusca* subsp. *fascicularis* (Driver *et al.*, 2020a), medida cultural que pode evitar os prejuízos provocados por esta espécie que podem atingir 30% de perda de produção (Smith, 1983).

### 2.2.2 *Cyperus difformis*

A negrinha, *Cyperus difformis* (Figura 3), é uma monocotiledónea de ciclo anual, da família Cyperaceae com origem em regiões tropicais e temperadas.

É uma planta em C3, particularmente adaptada a ambientes aquáticos e temperaturas elevadas, tal como a cultura do arroz nas condições mediterrânicas. Apesar de não ser tolerante à seca, à salinidade, à alcalinidade do solo e requerer água para o seu desenvolvimento, pode aparecer em campos de sementeira em seco ou sementeira direta (Chauhan & Johnson, 2008; Pedroso *et al.*, 2019). Em Portugal é referida a sua presença em pântanos e arrozais do Ribatejo no início do século XX por Coutinho (1913).

A germinação dá-se à superfície do solo (profundidades inferiores a 1 cm) e é estimulada pela luz e variação de temperaturas elevadas. No estudo realizado por Derakhshau & Gherekhloo (2013), a germinação ótima em condições controladas ocorreu entre 25-35 °C. A dormência inata das sementes permite-lhe manter níveis de viabilidade de 90%, mesmo ao fim de 6 anos. A sua capacidade germinativa é elevada (70% ao fim de 18 semanas), podendo produzir até 50 000 sementes por planta (Sanders, 1994).

Consequentemente, forma populações com grande densidade que podem provocar elevadas reduções na produtividade do arroz. Swain *et al.* (1975) reportam reduções entre 49 e 81% para densidades de 100 plantas.m<sup>-2</sup>, uma vez que o ciclo de vida entre 30 e 60 dias permite mais do que uma geração durante uma campanha (Chauhan & Johnson, 2008).



Figura 3. Infestação de *Cyperus difformis* em campo de arroz (original de Isabel Calha).

Um dos métodos eficazes para controlo desta espécie é a presença de uma lâmina de água de 4 cm (Chauhan & Johnson, 2008). Este facto é importante porque se trata de uma planta menos competitiva que as da família Poaceae, mas que ganhou relevância, pelo controlo químico eficaz daquela família de plantas, e ao facto de conseguir escapar aos tratamentos herbicidas de pós-emergência, devido aos seus ciclos biológicos muito curtos (Vidotto *et al.*, 2011).

### **2.3 Gestão de infestantes**

A maioria das infestantes que surgem nos campos agrícolas encontram-se no solo sob a forma de propágulos seminais ou propágulos vegetativos, que constituem o banco de sementes do solo. O conhecimento deste banco de sementes é de grande interesse na previsão de populações infestantes e estratégias para a sua gestão. Vários fatores influenciam a diversidade e densidade do banco de sementes, tais como as propriedades do solo, características climáticas, predadores e gestão de culturas (Nandan *et al.*, 2020, Osca *et al.*, 2021).

As sementes de algumas espécies permanecem viáveis no solo durante pouco tempo, mas algumas podem permanecer dormentes nos solos e germinar após longos períodos de tempo. Este processo de dormência das sementes e a sua viabilidade pode ser influenciado por fatores genéticos, ambientais e biológicos. Um exemplo claro é a manutenção da água no campo, onde flutuações na humidade do solo, nível de água, estratégias de rega e duração dos alagamentos afetam a dormência e a viabilidade das sementes e, por consequência, a germinação, composição e densidade do banco de sementes. Este fenómeno pode ser observado em espécies como em *Leptochloa* spp. ou *C. difformis*, entre outras, nas quais a lâmina de água tem um efeito positivo sobre a germinação e desenvolvimento das sementes (Vidotto, 2017; Osca *et al.*, 2021).

Em comparação com outros sistemas de cultivo, a gestão de infestantes no arroz alagado, principal método de produção deste cereal, é dificultada pela reduzida rotação de culturas e por flora especializada. Estas plantas surgem devido à existência de uma lâmina de água, própria do sistema de cultivo, que impede o crescimento de espécies não aquáticas, mas permite o desenvolvimento de espécies aquáticas ou semi-aquáticas (Vidotto, 2017).

Uma estratégia eficaz para a gestão de infestantes nunca poderá ser conseguida com uma única abordagem e, portanto, deve-se integrar mais do que um meio, sem dispensar o conhecimento da biologia para proteger a cultura da interferência com as infestantes. Os meios fundamentais da proteção integrada classificam-se em:

- Medidas indiretas culturais (semente certificada, falsa sementeira, cultivares competitivas, rotações, datas e densidades de sementeira) e outras que também contribuam para a redução do banco de sementes, como:
  - a. nivelamento do solo, que evita ter diferentes graus de desenvolvimento das espécies infestantes;
  - b. limpeza de alfaias, cujo objetivo principal é minimizar a introdução de propágulos;
  - c. dimensionamento adequado da rede de rega, que permita uma correta e atempada manutenção da água dos canteiros – redução do banco de sementes (Luzes, 1990; Canha, 2013).
- Meios diretos: mecânicos, biológicos ou químicos, onde se deve apostar numa alternância de modos de ação (Shekhawat *et al.*, 2020).

Quando a densidade de infestantes está abaixo de um certo nível, não há impacto significativo nas culturas, uma vez que as plantas jovens apresentam fraca competição com a cultura e podem fornecer uma cobertura viva para as terras agrícolas. Existe, porém, o período crítico, que representa o intervalo de tempo após sementeira e antes da colheita, em que a cultura deve estar livre de infestantes de forma a não haver reduções de produção (Nieto *et al.*, 1968). No caso do arroz, este período correspondente às fases iniciais do desenvolvimento e antes da colheita da cultura, sendo imperativo o avanço fenológico da cultura em relação às infestantes, de modo a manter a produtividade (Pacheco, 2015; Tian *et al.*, 2020).

## 2.4 Resistência adquirida aos herbicidas

O uso generalizado e indiscriminado de herbicidas nas últimas décadas levou ao aparecimento de resistências nas infestantes e reduziu a eficácia no controlo das mesmas (Tian *et al.*, 2020).

A resistência aos herbicidas é a capacidade hereditária de uma população para sobreviver à aplicação de um herbicida ao qual a população era, originalmente, sensível, sendo um processo mediado por inúmeros fatores (Figura 4) (WSSA, 1998).

<b>Genéticos</b>	1. Frequência dos genes de resistência 2. Quantidade de genes de resistência 3. Dominância dos genes de resistência 4. Adaptabilidade dos genes de resistência	<b>Herbicida</b>	1. Estrutura química 2. Local de ação 3. Atividade residual
<b>Biologia das infestantes</b>	1. Polinização cruzada versus auto-polinização 2. Capacidade de produção de sementes 3. Longevidade das sementes no banco de sementes do solo 4. Capacidade de deslocação de sementes e pólen	<b>Operacionais</b>	1. Dose do herbicida 2. Aplicação (condições ambientais, equipamento, duração) 3. Fatores agro-ecológicos (rotações, opções não químicas)

Figura 4. Fatores que influenciam a evolução da resistência a herbicidas em populações de infestantes (adaptado de Powles & Yu, 2010).

Há ainda outros conceitos que precisam de ser clarificados, tais como:

*Tolerância*: Capacidade hereditária de uma espécie sobreviver e reproduzir-se depois de um tratamento herbicida. A espécie tolerante nunca foi controlada por esse herbicida (WSSA, 1998).

*Resistência cruzada*: População que desenvolveu um único mecanismo de resistência a um herbicida, permitindo ser resistente a outros herbicidas com o mesmo modo de ação (MOA).

*Resistência múltipla*: População que desenvolveu vários mecanismos de resistência a vários herbicidas com diferentes modos de ação.

*Mecanismo de resistência*: Processo em que a planta consegue anular a atividade fitotóxica do herbicida.

Os diferentes mecanismos de resistência a herbicidas ilustram a resiliência evolutiva das populações infestantes a pressões extremas de seleção e podem ser divididos em duas categorias (Délye *et al.*, 2015; Gaines *et al.*, 2020; Matzrafi *et al.*, 2021):

- Resistência no local de ação (TSR – *Target-Site Resistance*) – Estes mecanismos alteram a eficácia do herbicida através de modificações estruturais (substituição de aminoácidos) do sítio de ligação ou a sobre-expressão da enzima-alvo.
- Resistência fora do local de ação (NTSR – *Non-Target-Site Resistance*) – Estes mecanismos incluem todos os processos que reduzam a concentração do herbicida disponível para interagir com a proteína no local de ação. Estão associados a vários processos anatómicos, celulares e fisiológicos, tais como redução de absorção e/ou translocação, distribuição sub-celular modificada e degradação do herbicida para compostos menos tóxicos (resistência metabólica).

A recomendação de se usar a dose indicada no rótulo previne a ocorrência de resistências. Doses superiores geralmente originam resistências do tipo TSR e doses reduzidas originam resistências do tipo NTSR.

#### **2.4.1 Situação mundial**

O primeiro caso de resistência a herbicidas, a nível mundial, foi detetado no Canadá em cenoura-brava (*Daucus carota* L.), em 1957 à substância ativa 2,4-D, introduzida em 1946 (Heap, 1997).

Em Portugal, segundo Calha *et al.* (1999), o primeiro caso conhecido foi a infestante do arroz, *Alisma plantago-aquatica* L. (Alismataceae) resistente ao bensulfurão-metilo (inibidor da ALS) em 1996.

Atualmente, as espécies do género *Echinochloa* são as mais problemáticas no nosso país, havendo populações resistentes às substâncias ativas penoxsulame e proflorizone (Oliveira, 2016; Barreda *et al.*, 2021).

Estão atualmente homologadas em Portugal, para a cultura do arroz, 16 famílias químicas de herbicidas, correspondentes a 12 modos de ação (MOA), dos quais se destacam os inibidores da enzima acetil-Coenzima A-carboxilase (ACCase), inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), inibidores da fotossíntese no fotossistema II (PSII) e inibidores da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase – EPSPs (Dias *et al.*, 2020, DGAV, 2022). Também usados noutros países produtores de arroz, estes quatro modos de ação constituem a maioria dos casos de resistência a nível mundial (Mascanzoni *et al.*, 2018; Barreda *et al.*, 2021; Beckie *et al.*, 2021).

Os inibidores da ALS afetam a síntese de aminoácidos de cadeia ramificada tais como valina, leucina e isoleucina, e incluem diferentes famílias químicas: imidazolinonas, sulfonilureias, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (Mallory-Smith *et al.*, 1990).

Os inibidores da ACCase perturbam a síntese de ácidos gordos, que por sua vez dificultam a produção de componentes lipídicos no sistema de membranas, causando danos na estrutura celular e, por fim, a morte da planta (Heap & Knight, 1982).

Nas infestantes da cultura do arroz foram identificadas resistências a diferentes herbicidas, nomeadamente (Busi *et al.*, 2006; Driver *et al.* 2020b; Barreda *et al.*, 2021; Heap, 2021):

- Inibidores de AACase (HRAC 1): *Echinochloa* spp., *C. difformis*, *Alisma plantago-aquatica*, *Leptochloa* spp. (*L. fusca* subsp. *fascicularis*), *Schoenoplectus* spp., *Eleusine* spp., *Ischaemum* spp.
- Inibidores de ALS (HRAC 2): *Echinochloa* spp., *Cyperus* spp. (*C. difformis*), *Alisma plantago-aquatica*, *Leptochloa* spp., *Monochoria* spp., *Ischaemum* spp., *Chloris* spp.
- Auxinas sintéticas (HRAC 4): *Echinochloa* spp., *Limnocharis* spp., *Limnophila* spp., *Sphenoclea* spp., *Fimbristylis* spp., *Digitaria* spp.;
- Inibidores da fotossíntese no fotossistema II (HRAC 5): *Echinochloa* spp.;
- Inibidores da fotossíntese no fotossistema II (HRAC 6) *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schldl (bentazona), *C. difformis* (propanil)
- Inibidores da biossíntese de carotenóides (HRAC 13): *Echinochloa* spp., *L. fusca* subsp. *fascicularis* (clomazona).



Além destas, verificam-se situações de resistência cruzada entre inibidores de ALS para *Echinochloa* spp. (Osuna *et al.*, 2002; Kaloumenos *et al.*, 2013; Altop *et al.*, 2014) e *C. difformis* (Osuna *et al.*, 2002; Ruiz-Santaella *et al.*, 2004). Também entre inibidores de ACCase em *Echinochloa* spp. (Heap, 2021). Há ainda casos de resistência múltipla em *Echinochloa* spp. (inibidores de ACCase e ALS) (Peterson *et al.*, 2018).

#### **2.4.2 Métodos de detecção**

Os testes mais utilizados para o estudo de resistências envolvem o crescimento de plantas a partir de amostras de sementes colhidas no campo de interesse (com suspeitas de falhas de eficácia) e a análise do seu comportamento após aplicação de uma ou mais doses de herbicida.

Estes estudos, designados de ensaios dose-resposta, baseiam-se na comparação da resposta a diferentes doses de herbicida entre a população de interesse e uma ou mais populações sensíveis, de referência. A resistência é confirmada se a população em estudo não for controlada com doses que controlam as plantas sensíveis.

Estes ensaios, muitas vezes trabalhosos e morosos, são normalmente conduzidos em estufa ou em câmara com ambiente controlado, requerendo grandes quantidades de espaço, não sendo práticos quando há necessidade de testar um grande número de amostras.

Em alguns casos, é possível optar por ensaios expeditos de diagnóstico baseados na resposta de sementes ou de plântulas, em vez de plantas inteiras. Após uma caracterização inicial, fornecem uma indicação do efeito provável da resistência sobre a atividade herbicida no campo. São muito úteis para rastreio (*screening*), como um primeiro passo na gestão de resistências, através da monitorização da sua natureza, distribuição e abundância numa determinada zona geográfica (Moss, 1995; Beckie *et al.*, 2000; RAP network, 2016).

Características dos ensaios biológicos:

- Concebidos para revelar diferenças na resposta fenotípica, baseiam-se no princípio da comparação por avaliação visual da exposição de organismos de interesse (resistentes) com as de uma referência sensível;
- Mortalidade, sobrevivência e crescimento são parâmetros frequentemente utilizados nestes ensaios;
- Os fatores que determinam a robustez das análises estatísticas são sobretudo o tamanho da amostra, repetições e número de doses ou concentrações.

Estes testes baseiam-se num conceito de concentração discriminatória (ou dose), correspondente à dose mínima de herbicida que evidencia a maior diferença nas curvas de dose-resposta entre populações resistentes e sensíveis e que resulta num controlo de, pelo menos, 80% das plantas sensíveis. A dose discriminatória é suscetível de variar para cada ensaio e só pode ser determinada por experimentação preliminar com populações resistentes e sensíveis, já conhecidas (Moss *et al.*, 1998).

Para o rastreio de populações resistentes, as plântulas podem ser cultivadas em papel de filtro ou agar (sem solo ou em placa de Petri). Não são tão precisos como os ensaios em vaso e por isso devem ser validados com ensaios de dose-resposta com planta inteira (Beckie *et al.*, 2000; RAP network, 2016).

## **2.5 Germinação e dormência**

Independentemente de se recorrer a ensaios com planta inteira, a maioria dos estudos de despiste e confirmação de resistência começam com uma amostra de sementes recolhida num campo onde se suspeita que exista resistência, ou seja, onde se repetiram falhas de eficácia de herbicidas. Neste sentido é necessário caracterizar a germinação e a quebra de dormência de sementes, quando a obtenção de plântulas para os ensaios assim o exige.

A semente é uma unidade de dispersão representativa da descendência geracional na maioria das plantas, ao participar na transferência de informação genética (Bewley, 1997). É capaz de permanecer longos períodos num estado dormente, retomando a sua atividade metabólica mediante determinadas condições endógenas e ambientais, normalmente associadas ao local de origem da espécie (Caixinhas, 1988; Matilla, 2008).

A germinação é o processo que marca o fim do período de dormência e o início do crescimento ativo e que pode seguir um modelo trifásico mediado por fatores essenciais: água, oxigénio, luz e, sobretudo, temperatura. Nas três fases dão-se os seguintes fenómenos, onde a transição da segunda para a terceira fase é irreversível (Caixinhas, 1988; Bewley, 1997):

1. Embebição da semente (hidratação dos tecidos + início da atividade metabólica);
2. Fase de ativação (germinação *sensu stricto*, sem evolução morfológica ou absorção de água);
3. Início do crescimento da radícula.

Durante o processo ocorrem variações hormonais (Figura 5). As hormonas fundamentais ao processo são o ácido abscísico, como inibidor produzido no embrião da semente, o ácido giberélico e o etileno, como promotores de germinação.

O ácido giberélico induz a hidrólise das paredes celulares, permitindo a emergência da radícula e o etileno diminui a sensibilidade da semente ao ABA endógeno. O nível de ABA produzido durante o desenvolvimento da semente é diretamente proporcional à quantidade de GA<sub>3</sub> necessária à sua germinação (Baskin & Baskin, 2004).

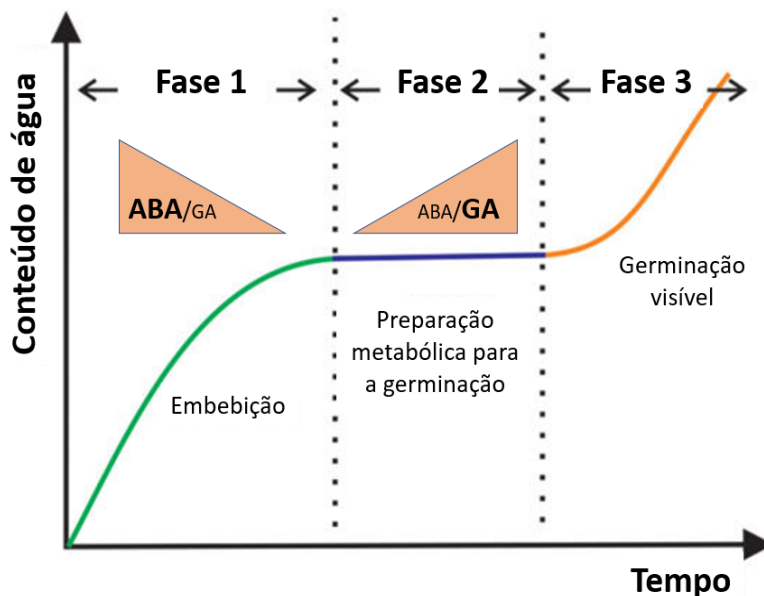


Figura 5. Representação da variação hormonal (ABA – ácido abcísico e GA<sub>3</sub> – ácido giberélico) e do conteúdo de água na semente, durante as fases do processo de germinação (adaptado de Daszkowska-Golec, 2011 e Pastor, 2018).

A maioria das plantas produzem sementes incapazes de germinar antes (e, em alguns casos, depois) da sua dispersão, num fenómeno designado de dormência. Sinteticamente pode ser considerado como um estado fisiológico de uma semente ou embrião que colocado em condições ambientais favoráveis, é incapaz de germinar (Bewley, 1997; Baskin & Baskin, 2004).

A dormência é assim uma estratégia ecológica que garante a sobrevivência das sementes e otimiza a sua germinação ao longo do tempo, sendo regulada por condições ambientais favoráveis (Caixinhas, 1988; Bewley, 1997).

Os principais fatores que influenciam a dormência são (Caixinhas, 1988; Baskin & Baskin, 2001):

Ambientais:

- Temperatura – sementes maduras de espécies anuais de primavera/verão, que completam o seu ciclo biológico antes do período de outono/inverno, estão dormentes ou condicionalmente dormentes e só germinam com temperaturas elevadas (35/15 °C) (temperatura diurna/ temperatura noturna), ou seja, no outono não germinam porque temperatura não é favorável;

- Gases – particularmente oxigénio, dióxido de carbono e etileno que se encontram no solo e que variam com as suas características ou, no caso do etileno, também como resposta fisiológica da planta (ou semente). Estes voláteis podem ter função indutora ou inibidora de dormência e/ou germinação. Uma elevada quantidade de sementes aquáticas perde dormência de forma mais eficaz, em imersão (anaerobiose);
- Água – consoante a espécie, a hidratação das sementes pode induzir ou inibir a dormência e germinação. A impermeabilidade da semente à água está intimamente relacionada com a dormência física;
- Luz – intimamente ligada à profundidade (obscuridade) a que se encontram as sementes e o tipo de solo que permite a passagens de determinados comprimentos de onda. Sementes com necessidades absolutas de luz para germinar não são induzidas em dormência pela obscuridade, mas sim pela temperatura;
- Ião nitrato – inibe a indução de dormência secundária. Funciona como mecanismo de deteção de falta de azoto, ou seja, quando existe uma reduzida competição de outras plantas.

Internos: intimamente relacionados com hormonas, já referidas, ou com o desenvolvimento do embrião;

Temporais: processo de pós-maturação do embrião ou perdas de inibidores naturais.

Consoante a capacidade germinativa de uma semente estar bloqueada antes ou depois da sua dispersão, a dormência pode ser dividida em dois tipos (Harris, 1961):

- *Primária* – período em que a semente está madura e não germina, mesmo em condições favoráveis. Em laboratório pode ser eliminada através do processo de estratificação, que em algumas espécies permite o decréscimo da forma fisiologicamente ativa de ácido abscísico (ABA), resultando no aumento da sua capacidade germinativa (Matilla, 2008).
- *Secundária* – quando sementes fisiologicamente maduras foram mantidas em condições desfavoráveis à germinação durante algum tempo e ao ser colocadas de novo em condições favoráveis, não germinam.

Baskin & Baskin (2004) classificam a dormência em cinco classes algumas das quais subdivididas em níveis e tipos, que apresentam características distintas, tornando o processo de quebra de dormência igualmente específico (Quadro 1).

A dormência fisiológica é a classe mais comum e pode ser dividida em três níveis: profunda, intermédia e não profunda e este último dividido em cinco tipos (1, 2, 3, 4 ou 5), consoante a resposta fisiológica à temperatura.

As sementes da família Poaceae possuem usualmente dormência fisiológica não profunda, onde a perda de dormência e o aumento da taxa de germinação é variável com o tempo e com as condições ambientais (Adkins *et al.*, 2002; Baskin & Baskin, 2004).

Quadro 1. Características das sementes consoante cada classe de dormência

<b>Classe de dormência</b>	<b>Características da semente</b>
<b>Sem dormência</b>	Absorve água e germina num curto período de tempo (até 4 semanas) consoante o ambiente favorável para a espécie
<b>Fisiológica:</b>	Absorve água e possui embrião com baixo potencial de crescimento, às vezes em combinação com limitações mecânicas das diferentes camadas da semente
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Profunda</b></li> <li>• <b>Intermédia</b></li> <li>• <b>Não profunda</b></li> </ul>	
<b>Morfológica</b>	Absorve água imediatamente, no entanto, requer tempo para crescer antes da germinação, devido ao embrião subdesenvolvido, mas diferenciado
<b>Morfo-fisiológica</b>	Absorve água imediatamente, com embrião subdesenvolvido e/ou indiferenciado e fisiologicamente dormente
<b>Física</b>	Tegumento impermeável
<b>Combinada</b>	Tegumento impermeável e embrião fisiologicamente dormente

(Adaptado de Baskin & Baskin, 2004; Kildisheva *et al.*, 2020)

As sementes com dormência fisiológica não profunda atravessam, na sua maioria, diversas alterações nas suas respostas fisiológicas a diversos fatores entre a dormência e a não dormência, não sendo um acontecimento único, mas um processo oscilante, designado de ciclo de dormência (Baskin & Baskin, 1985; Caixinhas, 1988).

A transição da dormência para não dormência faz com que as sementes ganhem capacidade de germinar em condições ambientais muito específicas. No entanto, se as condições desfavoráveis (ausência de luz ou temperaturas extremas, por exemplo) impedirem a germinação de sementes não dormentes, estas podem entrar em dormência secundária, diminuindo assim o leque de condições favoráveis à sua germinação até não conseguirem germinar em quaisquer condições.

### Quebra de dormência

A quebra de dormência de sementes ocorre naturalmente por ação dos animais, fogo, precipitação, temperatura, humidade, entre outras. No entanto existem processos artificiais que reproduzem esses efeitos (Quadro 2).

Quadro 2. Descrição de alguns tratamentos utilizados na quebra de dormência de sementes

Tratamentos	Descrição
<b>Químicos</b>	Escarificação química: ácido sulfúrico ou outros ácidos Objetivo: romper o tegumento permitindo torná-lo permeável à água e aos gases. Utilizado em casos de dormência física Estimulantes: nitrato de potássio (KNO <sub>3</sub> ), por exemplo
<b>Físicos</b>	Escarificação física: através de areia, lixa, punção ou corte Estratificação: a. Frio (reproduzindo as condições ambientais que a semente passaria no período de inverno antes de germinar na primavera): i. Seco: temperaturas baixas (inferiores a 10 °C) ii. Húmido: água fria (inferior a 10 °C) b. Calor (reproduzindo condições de verão para germinar no outono): i. Seco: através de aquecimento por micro-ondas ou outro similar ii. Húmido: água quente (superior a 20 °C) durante um período variável
<b>Pós-maturação</b>	Quebra de dormência durante o armazenamento em seco. O processo pode ser acelerado (AAR) através calor seco (superior a 50 °C)
<b>Hormonais</b>	Substâncias químicas como o ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ), por exemplo, através da imersão ou incorporadas no substrato de agar
<b>Mistos</b>	Os que combinam mais do que uma das técnicas referidas. Estes processos estão relacionados com a dormência combinada que algumas espécies de Poaceae apresentam

(Adaptado de Kildisheva *et al.*, 2020; Baskin & Baskin, 2020)

A dormência fisiológica, em particular, é eliminada por diversos tratamentos tais como a estratificação, pós-maturação, escarificação ou adição de giberelinas (Baskin & Baskin, 2004), a par de estímulos ambientais como a luz, temperatura e azoto do solo - ião nitrato (Bewley, 1997).

Para *L. fusca* subsp. *fascicularis*, Driver *et al.* (2020b) obtiveram elevadas germinações em sementes submetidas ao tratamento de estratificação por frio húmido (*wet chilling*) durante 2 semanas e depois colocadas numa câmara de germinação.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Ensaios de germinação de *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis*

##### 3.1.1 Material vegetal

As amostras de sementes maduras de leptocloa (*L. fusca* subsp. *fascicularis*), foram colhidas entre 8 de setembro e 1 de outubro de 2020 em 12 parcelas distribuídas pelas principais regiões orizícolas, indicadas por ordem decrescente de incidência (Dias, 2020): BH Tejo (R), BH Sado (A) e BH Mondego (M) – Figura 6. Foram colhidas panículas para sacos de papel e após limpeza e secagem em laboratório, foram armazenadas em seco, em frascos de vidro, em câmara frigorífica a 3 °C, na obscuridade.

Em complemento das amostras de campo foram estudadas duas populações obtidas de segunda geração em estufa (R06\_21 e R08\_21) com sementes ‘frescas’, colhidas em 2021 e colocadas em câmara de germinação no dia da colheita.

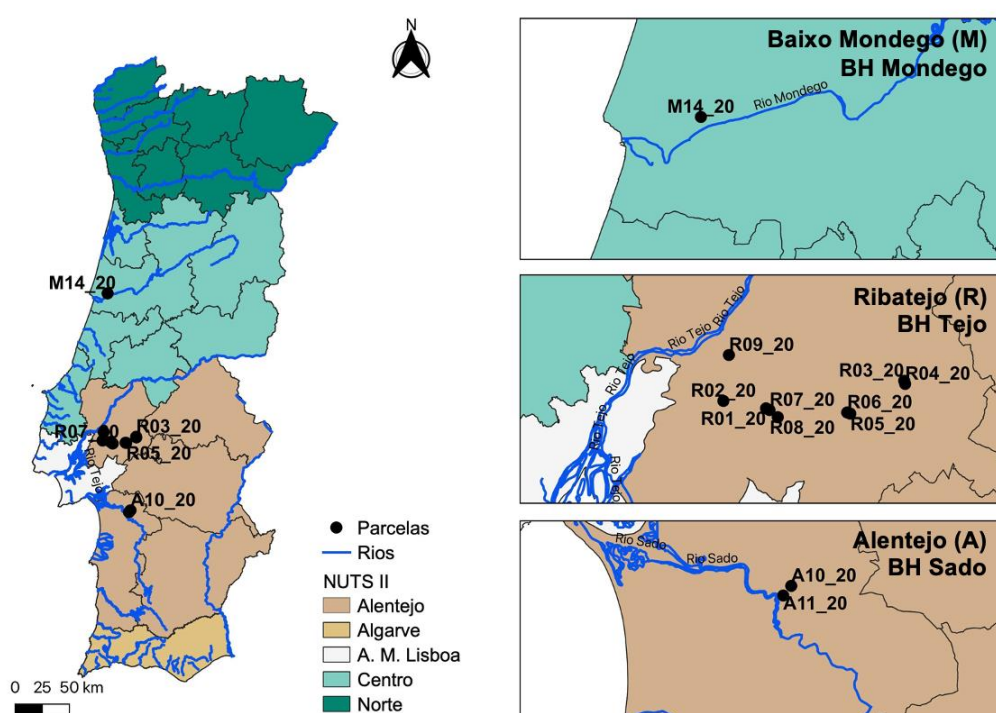


Figura 6. Distribuição das parcelas (campos de arroz) onde se fez a amostragem de plantas e recolha de sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* em 2020, nas três principais regiões orizícolas portuguesas.

### 3.1.2 Desinfecção das sementes

As sementes provenientes do campo podem vir contaminadas por fungos, o que requer uma desinfecção prévia. Para as sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* seguiu-se o protocolo publicado na literatura (Mahajan *et al.*, 2018) e que foi otimizado ao fim de alguns ensaios de modo a evitar contaminações de fungos nas placas de germinação. Este processo otimizado teve sempre a sequência seguinte: colocação de sementes em gobelé com 20 mL de etanol (Sigma) a 70% durante 20 min com agitação (agitador magnético); passagem das sementes para um cadinho Gooch perfurado (Staatlich Berlin) e enxaguamento por água corrente durante 5 min a fim de retirar o excesso de etanol; colocação das sementes num gobelé com 20 mL de hipoclorito de sódio a 4% (LabChem) onde se adicionaram 2 gotas de detergente da loiça (diminuir tensão superficial da água), durante 20 min, com agitação; passagem das sementes por água corrente durante 5 min, a fim de retirar o excesso de hipoclorito de sódio (ver Anexo 2). Nas sementes de segunda geração (R06\_21 e R08\_21) aplicou-se a desinfecção com a mesma duração e produtos que as anteriores, mas exclusivamente realizada em tubos Eppendorf em que os reagentes e água foram introduzidos com micropipeta, sem agitação, como descrito por Lindsey III *et al.* (2017).

### 3.1.3 Tratamentos para quebra de dormência

Para avaliação dos tratamentos de quebra de dormência selecionou-se a população R07\_20 pela elevada quantidade de semente disponível, resultante de uma grande infestação no campo (Figura 7). Consideraram-se germinadas, todas as sementes com radícula superior a 2 mm.



Figura 7. Panorama da infestação no campo R07\_20 à data da colheita de sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* (original de Isabel Calha).



A punção de sementes foi o primeiro tratamento de quebra de dormência selecionado e foi realizado para todas as populações, todavia pela dificuldade e morosidade do processo, procuraram-se alternativas mais expeditas. Os tratamentos para quebra de dormência foram selecionados a partir da classificação de Baskin & Baskin (2004) – Quadro 3. Neste quadro referem-se os 23 tratamentos de quebra de dormência (numerados de 2 a 24) que foram comparados com uma testemunha (tratamento 1).

Para comparação de métodos, escolheu-se a população R07\_20, pelo elevado número de sementes disponíveis e germinação no ensaio (aproximadamente 60%). Entre a data das primeiras colheitas no campo (outubro 2020) e o primeiro ensaio, decorreram 13 dias de armazenamento em seco a 3 °C, na obscuridade.

Quadro 3. Breve descrição das modalidades de quebra de dormência utilizadas

Métodos	Tratamentos	N.º
Físicos	Punção	8
	Imersão em H <sub>2</sub> O (RT) – 48 e 72 h	11; 12
	Polietilenoglicol (PEG)	14
	Estratificação por frio húmido (3 °C) – 15 dias, 5 meses em H <sub>2</sub> O	15; 16
	Estratificação por frio seco (-18 °C) – 1 mês	17
	Estratificação por calor húmido - H <sub>2</sub> O (80 °C) – 5 min	13
	Estratificação por calor seco (micro-ondas) – 3, 5 min	9; 10
Químicos	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 30, 60, 120, 180 s	3; 4; 5; 6
	KNO <sub>3</sub>	7
Pós-maturação	Pós-maturação acelerada – 24 h, 50 °C	18
Hormonais	GA <sub>3</sub> 0,01% em agar	19
	Imersão em GA <sub>3</sub> , 48 h	20
Mistos	Estratificação húmida (5 meses) + punção	2
	AAR + imersão H <sub>2</sub> O (RT) – 72 h	21
	H <sub>2</sub> O (RT), 72 h + GA <sub>3</sub> 0,01% em agar	22
	H <sub>2</sub> O (RT), 72 h + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30 s	23
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30 s + H <sub>2</sub> O (RT), 72 h	24

RT – temperatura ambiente

Todos os tratamentos foram, salvo exceções referidas, realizados em placa de Petri de PVC (90 mm), com 25 mL de agar (1%) como substrato, seladas com parafilme a fim de evitar perdas por evaporação, e colocadas em câmara ARALAB com alternância de temperaturas 23/18 °C, 16 h de luz. No entanto, em alguns ensaios iniciais com a população R09\_20, foi testada a alternância de temperaturas 30/25 °C, 16 h de luz. Em cada placa de Petri foram colocadas 50 sementes desinfetadas.

A avaliação da germinação (radícula > 2 mm) foi feita de três em três dias, até um máximo de 30 dias após sementeira (DAS). Os métodos utilizados para cada tratamento basearam-se nos tratamentos de quebra de dormência para outras infestantes referidos na literatura e adaptados para a espécie em estudo.

### 3.1.3.1 *Tratamentos físicos*

Os tratamentos físicos testados foram a escarificação física através de punção, a imersão de sementes em água à temperatura ambiente (RT), estratificação a frio e quente e ainda a utilização de polietilenoglicol (PEG).

O tratamento por punção foi realizado do seguinte modo: as sementes foram previamente embebidas em água destilada durante 24 h à temperatura ambiente (RT) e foram sujeitas a punção do tegumento com um alfinete esterilizado (Figura 8), na parte mais afastada possível do embrião, oposta ao hilo (Sung *et al.*, 1987; Gianinetti *et al.*, 2007).



Figura 8. Pormenor da realização de punção às sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis*, à lupa binocular (ampliação 20x) (original de João Santos).

Outro dos tratamentos utilizados baseou-se em embeber sementes em diferentes concentrações de polietilenoglicol – Polyethylenglycol 4000 Merck – HO (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub> H (Massa Molar: 3500-4500). Posteriormente (24h) foram semeadas em placas de Petri com agar 1%, adaptando os métodos apresentados por Michel & Kaufmann (1973), Dorado *et al.* (2009) e Boddy *et al.* (2013).

Prepararam-se cinco soluções de PEG de concentrações entre 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35 g.L<sup>-1</sup> água a partir da diluição da solução-mãe com a concentração mais elevada. À temperatura de 25 °C estas concentrações de PEG correspondem, respetivamente aos seguintes potenciais de água ( $\psi$ ): 0; -0,0008; -0,0011; -0,0013; -0,0016 e -0,0019 MPa (Michel & Kaufmann, 1973).

A estratificação por calor seco foi realizada por micro-ondas, tendo as sementes sido colocadas em placa de Petri de vidro em micro-ondas (800 W) durante 3 e 5 min e posteriormente desinfetadas (Abu-Elsaoud & Qari, 2017). No tratamento de estratificação por calor húmido (Figura 9), as sementes foram colocadas em gobelé com água destilada a 80 °C. Foram mantidas a essa temperatura em estufa de laboratório (Memmert) durante 5 min, posteriormente foram filtradas e colocadas a germinar (Mahajan *et al.*, 2018).

A estratificação por frio seco consistiu em colocar 100 sementes por população em tubos Eppendorf identificados, durante um mês à temperatura de -18 °C em câmara frigorífica. Após esse período foram desinfetadas e colocadas a germinar. Na estratificação por frio húmido, as sementes foram colocadas em copos de precipitação de 100 mL com 50 mL água destilada e fechados com parafilme, colocados em câmara a 3 °C, na obscuridade. Este processo decorreu entre 2 de novembro de 2020 e 7 de abril de 2021, após o qual as sementes foram colocadas a germinar (Boddy *et al.*, 2013).

Foi ainda realizado o método de imersão de sementes num gobelé com água destilada à temperatura ambiente durante 48 e 72 h. Após esse período foram filtradas e colocadas a germinar.

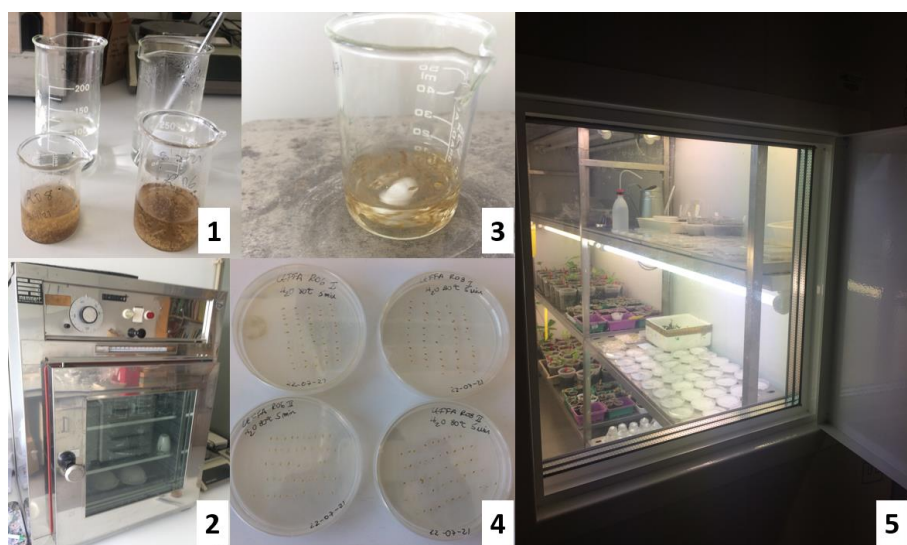


Figura 9. Sequência laboratorial do tratamento de estratificação por calor húmido de sementes [1 – imersão em água a 80 °C; 2 – gobelés colocados em estufa de incubação durante 5 min a 80 °C; 3 – desinfecção com agitação; 4 – colocação das sementes em placa de Petri com agar (1%); 5 – colocação em câmara de germinação a 23/18 °C, 16 h luz] (originais de João Santos).

### 3.1.3.2 *Tratamentos químicos*

Realizaram-se tratamentos com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), para escarificação química do tegumento das sementes e com nitrato de potássio ( $KNO_3$ ), uma vez, que o ião nitrato é um elemento importante no processo de germinação, como referido no Capítulo 2.

Para avaliar o melhor período de tempo de escarificação sem inviabilizar o embrião, realizaram-se vários tratamentos com ácido sulfúrico. Colocaram-se as sementes num gobelé durante quatro períodos de 30, 60, 90 e 180 s em contacto com ácido sulfúrico (95-97%, Merck). Foram transferidas para cadinho Gooch e passadas por água corrente. A desinfecção, nesta modalidade foi feita pós-escarificação (Scarabel *et al.*, 2003).

No que refere ao nitrato de potássio, as sementes foram colocadas em placa de Petri com uma folha de papel de filtro ADVANTEC 1, previamente embebida com 2 mL de uma solução de  $KNO_3$  (99,7%, Sigma Aldrich) 0,2% (W/V), foram desinfetadas e colocadas a germinar a 23/18 °C e 30/25 °C, 16 h de luz (Bian *et al.*, 2013).

### 3.1.3.3 *Tratamento pós-maturação*

No processo de pós-maturação acelerada (AAR), as sementes foram colocadas numa placa de Petri numa estufa de laboratório a 50 °C durante 24 h, foram seguidamente desinfetadas e colocadas a germinar (Taylorson & Brown, 1977).

### 3.1.3.4 *Tratamento hormonal*

As sementes foram colocadas em contacto com ácido giberélico (Roth) numa concentração de 0,01% sob duas formas diferentes:

- Incorporado no substrato de agar;
- Imersão em solução durante 48 h.

Após esse período, colocaram-se a germinar em dois regimes térmicos: 23/18 °C e 30/25 °C, 16 h de luz (Darrudi *et al.*, 2015).

### 3.1.3.5 *Tratamentos mistos*

Os tratamentos mistos conjugaram tratamentos dos diferentes tipos de métodos já referidos e normalmente estimulam a quebra de dormência combinada das sementes (Quadro 3).

### 3.1.4 Curvas de germinação

Nos estudos populacionais, a germinação é geralmente medida como uma percentagem do número total de sementes de uma amostra que iniciam o crescimento da radícula dentro de um determinado período de observação. A transposição para um gráfico, da germinação acumulada de sementes (percentagem) numa amostra sobre o tempo, assume normalmente a forma de uma curva sigmóide. com três parâmetros fundamentais: a germinação máxima, a velocidade de germinação e o tempo necessário para atingir 50%, 75% ou 100% da germinação máxima acumulada (Inglis & Waycott, 2001).

O desenvolvimento das sementes foi representado por curvas de regressão da germinação acumulada em função do tempo através da função Weibull (Eq.1) de três parâmetros (Weibull & Sweden, 1951). Embora esta função seja expressa numericamente, permite interpretar os seus parâmetros biologicamente (Ritz *et al.*, 2013).

$$G(\%) = a(1 - \exp(-(\frac{x}{b})^c)), a > 0 \quad \text{Eq.1}$$

O tempo necessário para atingir 50% da germinação (t50) é calculado pelo inverso da equação de Weibull (Ávila *et al.*, 2019):

$$X = \left\{ \left[ \left[ \text{LN} \left( \left( \frac{Y}{a} \right) - 1 \right) (-1) \right] (-1) \right]^{\left( \frac{1}{c} \right)} \right\} (b) \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: G – percentagem de germinação acumulada; X – número de dias estimado para obter 50% de germinação (t50); LN – logaritmo neperiano (base e); a – valor máximo da germinação estimada; b – tempo (dias) estimado para obter 63,21% da germinação máxima (a); c – velocidade de germinação (%) em função do tempo (b); Y – percentagem de germinação acumulada previamente estipulada em 50%; x – duração da germinação (dias); exp – base do logaritmo neperiano.

### 3.1.5 Análise estatística

O delineamento experimental dos ensaios de germinação foi casualizado, com duas repetições. Os dados recolhidos foram organizados em folha Excel, onde foram calculadas a média, desvio padrão e intervalo de confiança a 95% das repetições no fim de cada ensaio.

Testou-se a normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias com recurso ao teste de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respetivamente.

Optou-se pela realização de uma ANOVA usando um fator (tratamento) e do teste 'post-hoc' de Duncan ( $p < 0,05$ ) ou t-Student, consoante o mais adequado. Foi utilizado o software estatístico R Versão 4.1.1 (R Core Team, 2021) e o *package* "easynova" (Arnhold, 2013).

Para o ensaio misto da estratificação húmida com punção produziram-se curvas de germinação acumulada, utilizando-se o modelo Weibull/WB.3 disponível no software estatístico R (Ritz *et al.*, 2013).

## 3.2 Ensaios de confirmação de resistência em *Cyperus difformis*

### 3.2.1 Material vegetal

A amostra colhida em 2020 (A12\_20) teve origem num arrozal de Alcácer do Sal, no qual se suspeitava de falha de eficácia da substância ativa bentazona (Figura 10).

As inflorescências foram colhidas para sacos de papel e transportadas para laboratório onde foram posteriormente secas e limpas. As sementes recolhidas foram armazenadas em câmara frigorífica a 3 °C, na obscuridade.

Esta amostra com presumível resistência foi comparada com outras três populações suscetíveis à bentazona – A07\_19, A10\_19 e R09\_19 (A – Alentejo, R – Ribatejo) – colhidas no ano anterior (2019).

O histórico de aplicações herbicidas no ano de 2020 no campo A12\_20 foi uma aplicação inicial de “Aura” (profoxidime, 200 g.L<sup>-1</sup>, EC, BASF) para espécies da família Poaceae e uma segunda aplicação com “Permit” (halosulfurão-metilo, 750 g.kg<sup>-1</sup>, WG, Nufarm), “Herbinexa 40 K” (MCPA (sal de potássio), 400 g.L<sup>-1</sup>; SC, Nufarm) e “Basagran” (bentazona, 480 g.L<sup>-1</sup>, SL, BASF) para Cyperaceae e dicotiledóneas.



Figura 10. Panorama geral (A) e pormenor (B) da infestação de *Cyperus difformis* no campo de arroz de Alcácer do Sal A12\_20 (originais de João Santos).

### 3.2.2 Ensaios de sensibilidade a herbicidas

Para cada população pesaram-se cerca de 500 sementes (PMS= 0,003 g - RGB Kew, 2021) em cadinho de porcelana. O procedimento de limpeza das sementes, com separação das maiores impurezas e cascas das sementes foi efetuada com “post-it” em cadinho de porcelana, por se tratar de sementes muito leves e de reduzida dimensão. Depois de limpas, foram colocadas em placas de Petri de PE esterilizadas 90 x 15 mm, com 25 mL de agar (1%) (Biokar Diagnostics), seladas com Parafilm® e colocadas em câmara ARALAB (23/18 °C, 16 h de luz) para induzir a germinação e posterior transplantação (BBCH 10), processo comum a todas as amostras (Figura 11).

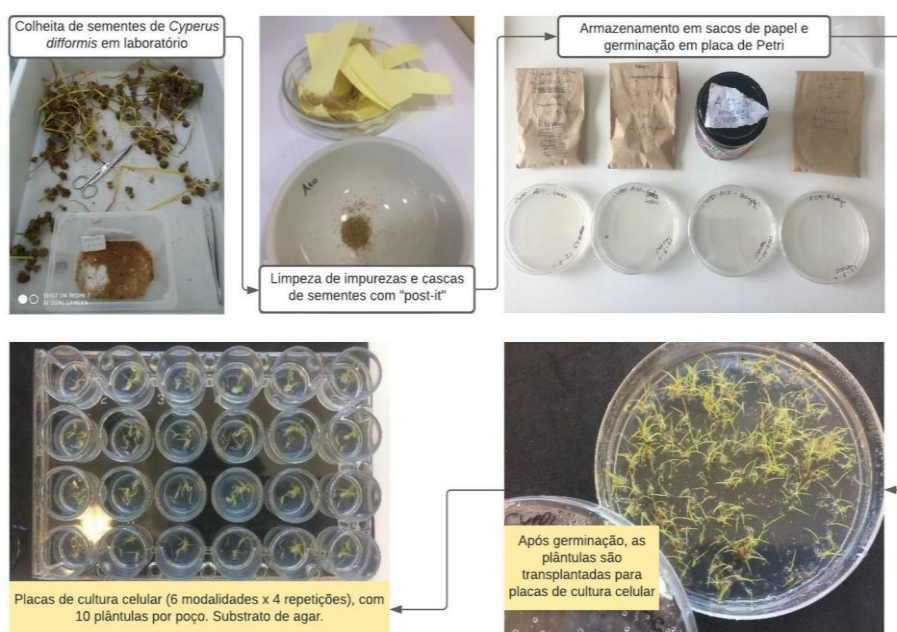


Figura 11. Sequência laboratorial entre a colheita e a testagem de herbicidas a *C. difformis* em microplacas de cultura celular com agar (originais de João Santos).

Os herbicidas avaliados nos ensaios foram “Viper” (penoxsulame, 20 g.L<sup>-1</sup>, OD, Lusosem), herbicida de pós-emergência sistémico para controlo de Poaceae, Ciperaceae e dicotiledóneas do arroz e “Asteca mays” (bentazona + terbutilazina, 200 g.L<sup>-1</sup> + 200 g.L<sup>-1</sup>, SC, Sapec), herbicida de pós-emergência com ação de contacto e residual para o controlo de infestantes dicotiledóneas e ciperáceas do milho (Quadro 4).

Quadro 4. Caracterização dos dois herbicidas utilizados nos ensaios

Família química	Substância ativa	Modo de ação	Código HRAC	Produto comercial
Triazolopirimidina	penoxsulame	Inibidores da acetolactato sintase	2	Viper®
Benzotiadiazina	bentazona + terbutilazina	Inibidores da fotossíntese no fotossistema II	6	Asteca Mays®



Nestes ensaios de concentração-resposta (Quadro 5), o parâmetro avaliado foi a fitotoxicidade, de acordo com uma escala (0-100% sintomas). Os sintomas mais relevantes foram o albinismo ou necrose das folhas em cada repetição (de 10 plântulas), entre os 8 e os 16 dias após tratamento.

Quadro 5. Ensaios de sensibilidade a herbicidas na espécie *Cyperus difformis*, realizados entre 2020 e 2021

Ensaio	Populações	Substância ativa	Concentrações (mg.L <sup>-1</sup> )	Início	Fim
1	A12_20	bentazona	0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10	20 out 2020	28 out 2020
2	A07_19	bentazona	0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10	19 nov 2020	2 dez 2020
	A10_19 R09_19	penoxsulame			
3	A12_20	bentazona	0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10	21 dez 2020	6 jan 2021
	A07_19	penoxsulame			
4	A12_20	bentazona	0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10	4 mai 2021	12 mai 2021
	A10_19	penoxsulame			
5	A12_20	bentazona penoxsulame	0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10	24 jun 2021	13 jul 2021
	A07_19				
	A10_19				
	R09_19				

O delineamento experimental de cada ensaio foi casualizado, onde as modalidades correspondem a cinco concentrações, com quatro repetições cada e as populações utilizadas variaram de duas a quatro populações por ensaio. A testemunha corresponde em todos os ensaios à modalidade que contém apenas agar (1%), sem aplicação de herbicida.

A sequência de ensaios apresentada adveio da experimentação e apuramento das condições dos mesmos, nomeadamente as concentrações, tipo de ensaio (com sementes ou plântulas) ou tipo de placa a utilizar.

O ensaio inicial (ensaio 1) foi realizado em placa ELISA (12 x 8 poços), com 6 modalidades, 12 repetições, com uma plântula por poço.

No ensaio 4 seguiu-se o método de incubação de sementes em tubos Eppendorf com diferentes concentrações dos herbicidas (Burgos *et al.*, 2013).

Nos ensaios 2, 3 e 5 utilizaram-se os mesmos procedimentos entre si, ao serem utilizadas microplacas de cultura celular (6 x 4 poços), havendo, no entanto, um apuramento de concentrações, a fim de se encontrar uma concentração discriminatória, dos dois primeiros, para o último ensaio (Messelhäuser *et al.*, 2021) – ver Anexo 3.

Para o ensaio com as quatro populações (ensaio 5) prepararam-se soluções de: 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100 mg.L<sup>-1</sup>, por diluição de uma solução mãe (100 mg.L<sup>-1</sup> s.a.) preparada a partir dos produtos comerciais referidos no Quadro 4.

Em tubos graduados FALCON de 15 mL colocaram-se 9 mL de agar 1% e 1 mL de cada solução de modo a diluir e obter as concentrações pretendidas nas microplacas.

Cada poço da microplaca foi preenchido com 1 mL de solução de agar com herbicida e 10 plântulas de *C. difformis*.

### **3.2.3 Análise estatística**

Os dados de todos os ensaios foram sujeitos a análise de variância para testar se existem ou não diferenças significativas nas médias dos sintomas de fitotoxicidade nas concentrações herbicidas. Foi testada, em cada conjunto de dados, a normalidade dos dados e a homogeneidade de variância, que foram rejeitadas.

Optou-se pela realização de um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o respetivo teste 'post-hoc' de Dunn ( $p < 0,05$ ) (Dunn, 1964) para comparação de médias entre modalidades. Foi utilizado o software estatístico R, versão 4.1.1 (R Core Team, 2021) e o *package* "*dunn.test*". Os gráficos foram produzidos utilizando o *package* "*drc*" do software R (Ritz *et al.*, 2015).

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1 Ensaio de germinação de *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis***

#### **4.1.1 Desinfecção das sementes**

O processo de desinfecção foi otimizado com a experiência nos diferentes ensaios. Inicialmente o período de 5 min em etanol (70%) não foi eficaz, nem a combinação de 5 min em etanol (70%) com 5 min em hipoclorito de sódio (4%).

O processo de imersão durante 20 min em etanol (70%), seguida de lavagem e imersão durante 20 min em hipoclorito de sódio 4% revelou-se eficaz no controlo de fungos nas sementes em placas de Petri.

No entanto, ao contrário do referido por Mahajan *et al.* (2018), em que é demonstrado que uma imersão em hipoclorito de sódio durante 30 min aumentou a germinação em sementes de *Brassica tournefortii* Gouan, aparentemente o hipoclorito de sódio (4%) não teve ação sobre a germinação das sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis*, nas condições ensaiadas.

A realização da desinfecção em tubos Eppendorf - processo utilizado nas populações R06\_21 e R08\_21 revelou-se eficaz, na medida em que não surgiram contaminações fúngicas nas sementes, no entanto tem o inconveniente de não poder sofrer agitação magnética. A ausência de agitação obriga à remoção das lemas manualmente, tornando o processo mais moroso, pelo que, idealmente, será preferível optar pelo processo de imersão em etanol e hipoclorito de sódio, com agitação, intercalada com enxaguamento.

#### **4.1.2 Tratamentos para quebra de dormência**

Como referido no Capítulo 2, o método físico de punção é eficaz na maioria das espécies de Poaceae com dormência fisiológica não profunda. Esse primeiro tratamento, por se tratar de um método moroso, levou a que se procurassem outros tratamentos. Testaram-se 24 tratamentos (Quadro 6), cujos resultados se apresentam na Figura 12.

Quadro 6. Lista de tratamentos aplicados às sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* da população R07\_20, com respectivos períodos de armazenamento em seco (T. A), a 3 °C na obscuridade, antes de cada tratamento

N.º	Tratamento	T. A	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2021	2021
			R01_20	R02_20	R03_20	R04_20	R05_20	R06_20	R07_20	R08_20	R09_20	A10_20	A11_20	M14_20	R06_21	R08_21
1	Testemunha	13							X		X				X	X
2	Estr. frio húmido (5 meses) + punção	55	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
3	Escarificação química H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 30 s	48							X							
4	Escarificação química H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 60 s	94							X							
5	Escarificação química H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 120 s	94							X							
6	Escarificação química H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 180 s	94							X							
7	KNO <sub>3</sub>	13							X		X					
8	Escarificação física (punção)	90							X							
9	Estr. Calor seco micro-ondas – 3 min	322							X							
10	Estr. Calor seco micro-ondas – 5 min	322							X							
11	Imersão H <sub>2</sub> O (RT) – 48 h	36							X		X					
12	Imersão H <sub>2</sub> O (RT) – 72 h	48							X							
13	Estr. Calor húmido H <sub>2</sub> O (80 °C) – 5 min	294							X						X	X
14	Polietilenoglicol (PEG)	69							X							
15	Estr. frio húmido (3 °C) – 15 dias	21							X		X					
16	Estr. frio húmido (3 °C) – 5 meses	55	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
17	Estr. frio seco (-18 °C) – 1 mês	324							X							
18	AAR – 24 h, 50 °C	94							X							
19	GA <sub>3</sub> 0,01% em agar	36							X		X					
20	Imersão em GA <sub>3</sub> , 48 h	36							X		X					
21	AAR + imersão H <sub>2</sub> O (RT) – 72 h	94							X							
22	Imersão H <sub>2</sub> O (RT), 72h + GA <sub>3</sub> 0,01% em agar	48							X							
23	Imersão H <sub>2</sub> O (RT), 72 h + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30 s	48							X							
24	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30 s + imersão H <sub>2</sub> O (RT), 72 h	48							X							

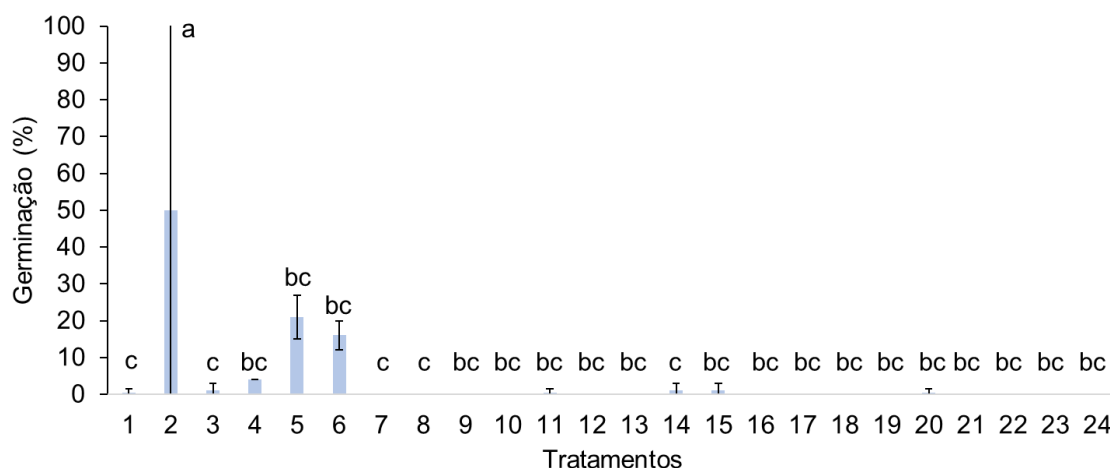


Figura 12. Germinação das sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* da população R07\_20 em câmara de crescimento (23/18 °C, 16 h luz), para todos os tratamentos realizados (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias de germinação entre tratamentos (teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Neste ensaio em particular houve germinações em apenas dez dos tratamentos, dos quais se destaca o tratamento 2, misto de estratificação por frio húmido durante 5 meses, com punção (Figura 13).

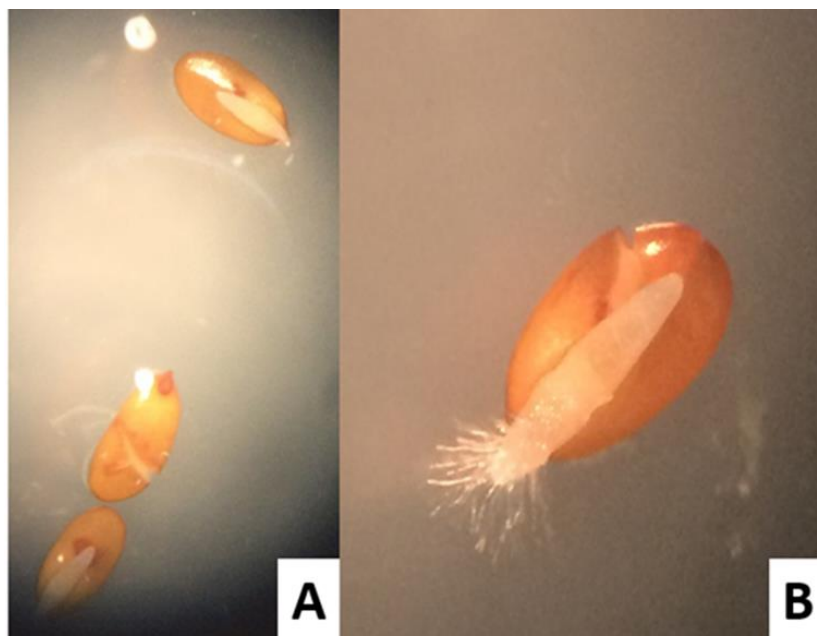


Figura 13. Rompimento do tegumento – A e saída da radícula – B (4 DAS) em sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* da população R07\_20, sujeitas ao método físico misto de estratificação por frio húmido e punção, para quebra de dormência. Observação em lupa binocular (ampliação 20x) (originais de João Santos).

Este tratamento permitiu uma germinação média de 50% e foi realizado com sementes nuas (sem lemas nem páleas), o que foi conseguido através da agitação durante a desinfecção ou remoção manual. A punção foi realizada no extremo oposto ao hilo, como descrito no Capítulo 3.

Além disso verifica-se que os tratamentos 5 e 6 (escarificação química com ácido sulfúrico durante 120 e 180 s, respetivamente), permitiram obter uma taxa de germinação de 21% e 16%, respetivamente. Os restantes tratamentos com sementes germinadas (1, 3, 4, 11, 14, 15 e 20) apresentaram taxas germinativas inferiores a 5%.

Estes resultados corroboram os obtidos por Baskin *et al.* (1999) que, sem especificarem a subespécie afirmam que: “as sementes de *L. fusca* recém-maduras estavam dormentes e, após 5 meses de estratificação a frio, 53% germinaram a 30/20 °C”.

Os resultados da escarificação química dão oportunidade de conjecturar sobre o fenómeno de dormência desta subespécie. Isto é possível pela observação de alguma escarificação do tegumento (Figura 14), mas que por heterogeneidade de aplicação, uma vez que as sementes são minúsculas e o tratamento necessitar de uma superfície com orifícios para retirar o excesso de ácido, não foi uniforme. Temos assim sementes escarificadas e outras que não (onde foram retiradas as estruturas envolventes a posteriori) e ainda algumas que parecem danificadas ao nível do embrião ou inviáveis.



Figura 14. Sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* da população R07\_20 após escarificação química com  $H_2SO_4$  durante 120 s. Observação em lupa binocular (ampliação 20x) (original de João Santos).

Este método (escarificação química), se fosse possível otimizar, seria uma alternativa mais expedita do que a punção para obter plantas desta espécie. Pelos resultados obtidos o ponto de partida serão os 120 s de contacto com ácido sulfúrico e a partir daí será necessário perceber que outros tratamentos ou métodos complementares poderiam torná-lo mais eficiente.

Scarabel *et al.* (2003) otimizaram o processo de germinação de sementes de *Alisma plantago-aquatica* conjugando escarificação química por ácido sulfúrico com a adição de éter ou clorofórmio. Essas substâncias não foram testadas neste trabalho pelo que se coloca a hipótese destes resultados serem melhorados com a conjugação da escarificação química e aplicação dessas substâncias, em trabalhos futuros.

As sementes sujeitas aos tratamentos por calor, nomeadamente estratificação por calor seco (tratamentos 9 e 10) e húmido (tratamento 13), não germinaram. Como referido por Baskin & Baskin (2001), as temperaturas elevadas em espécies de primavera-verão induzem a dormência. Os resultados destes tratamentos por calor corroboram essa afirmação.

Os mesmos autores referem que em sementes de *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. a dormência secundária foi induzida por deficiência de oxigénio a 25 °C mas não a 7 °C.

As sementes foram imersas à temperatura ambiente (anaerobiose) nos tratamentos 11, 12, 20, 21, 22, 23 e 24. Nestes tratamentos não houve germinação pelo que se pode colocar a hipótese de ter sido induzida dormência secundária nas sementes e essa ser a causa da não germinação das mesmas.

Ao contrário do referido por esses autores, apesar de serem espécies distintas, a estratificação por frio húmido (tratamentos 15 e 16) não resultou na quebra de dormência, não havendo germinação expressiva (germinaram apenas duas sementes no tratamento 15).

Em relação ao fator água, as sementes sujeitas ao tratamento com diferentes concentrações de polietilenoglicol (tratamento 14) tiveram uma germinação quase nula. Apesar de ter sido utilizado meio de agar em vez de papel de filtro, de modo a manter a percentagem de humidade da semente, efetivamente os potenciais hídricos conseguidos foram muito reduzidos quando comparados com os referidos na literatura (Capítulo 3), não sendo um tratamento eficaz, a par dos tratamentos com humidade já referidos.

Além deste ensaio com a população R07\_20, todas as restantes populações foram sujeitas a dois tratamentos comuns: a estratificação por frio húmido durante 5 meses e o tratamento misto que juntou essa estratificação por frio húmido e punção (Anexo 2).

Neste último tratamento as populações que melhor germinaram, de cada região, foram a R03\_20, A11\_20 e M14\_20 (75%, 60% e 70%, respetivamente). Por sua vez, no tratamento 2, para estas populações, a taxa de germinação variou entre 2% (R03\_20) e 12% (A11\_20).

A população da bacia do Sado (A11\_20), obteve a maior taxa de germinação das três regiões no tratamento 16 (12%), no entanto é uma percentagem sujeita a muita variabilidade e que não é suficientemente expressiva – Figura 15.

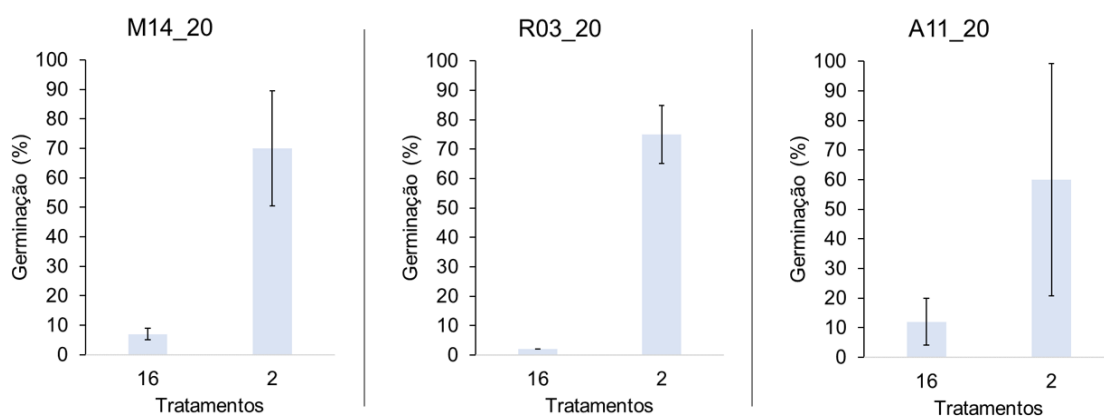


Figura 15. Germinação média das sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* das populações M14\_20 (BH Mondego) R03\_20 (BH Tejo) e A11\_20 (BH Sado) para os dois tratamentos comuns a todas as populações: estratificação por frio húmido durante 5 meses (16) e estratificação por frio húmido durante 5 meses com punção (2) (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média. As diferenças entre médias são significativas entre tratamentos, nas três populações (t de Student,  $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos podem indicar que a punção permitiu ultrapassar a dormência primária em 48-73% de sementes. As sementes que não germinaram apesar da punção (25-40%) podem estar na fase de dormência secundária.

Estes resultados demonstram claramente que existe a necessidade de danificar a semente, mais do que simplesmente escarificar superficialmente o tegumento da semente (Sung *et al.*, 1987).

Baskin & Baskin (2001) referem que em sementes perfuradas existe libertação de maior quantidade de etileno e que este, por sua vez, promove a germinação do embrião. Esta poderá ser uma explicação para o resultado do tratamento misto de estratificação por frio húmido com punção, nas populações estudadas. Corroborando ainda a tese de Osca (2013), quando afirma que as sementes desta espécie não germinam se estiverem sempre com o mesmo nível de água, respondendo a alteração de estímulos.

Essa escarificação em ambiente orizícola pode dar-se, sobretudo, ao nível do solo, nomeadamente no contacto com as partículas do solo, através da fauna e microfauna aí existente ou mesmo por fenómenos químicos naturais. Devido às dimensões tão pequenas das sementes será difícil colocar a hipótese desse estímulo para danificar as plantas advir de práticas agrícolas, como a mecanização.



Baskin & Baskin (2004) referem que sementes com dormência fisiológica não profunda apresentam uma germinação regular através de punção.

Os mesmos autores (Baskin & Baskin, 2004) referem que o ácido giberélico ( $GA_3$ ) e a escarificação promovem a germinação e, que consoante as espécies, a estratificação a quente ou a frio quebra a dormência das sementes e a pós-maturação pode acontecer durante o armazenamento a seco.

Os tratamentos utilizados neste trabalho corroboram em parte a afirmação anterior, no sentido que a escarificação (mecânica e química) promoveram a germinação das sementes. No entanto, o armazenamento a seco e o  $GA_3$  aparentemente não tiveram efeito na germinação, pelo que deveriam ser testados intervalos de tempo que permitissem corroborar as hipóteses de Baskin & Baskin (2004). O tratamento por estratificação a frio não apresentou resultados significativos para corroborar a afirmação.

A população R09\_20 foi, a par com a R07\_20 inicialmente considerada como “população teste” e daí ter sido sujeita a mais alguns testes que a maioria das restantes populações. Nesta situação (Figura 16), apresentou uma germinação muito inferior no tratamento 2, face à população R07\_20, daí a sua exclusão como “população teste”. Pode-se ver, no entanto, que a população R07\_20 respondeu positivamente ao tratamento de pós-maturação acelerada, apesar da germinação ser inferior a 10%. Estes resultados corroboram a tese de uma dormência fisiológica já referida em Baskin *et al.* (2014), típica da família Poaceae ou de uma dormência combinada como defendido por Driver *et al.* (2020b).

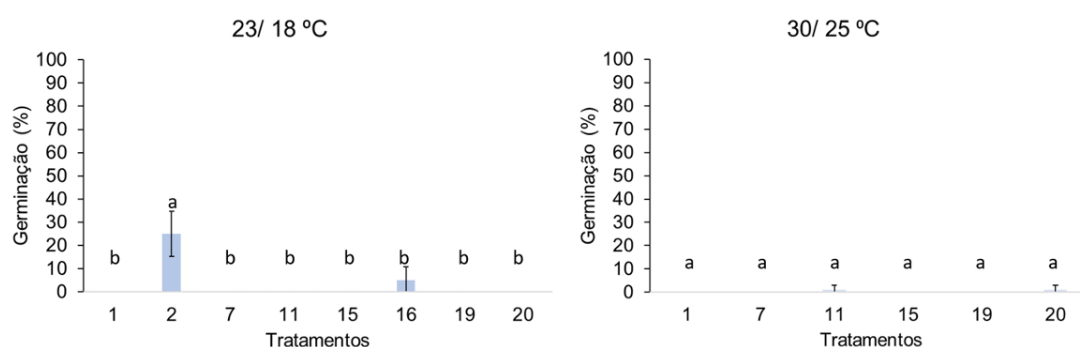


Figura 16. Germinação das sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* da população R09\_20 com alternância de temperatura entre 23/18 °C (esq.) e 30/25 °C (dir.), 16 h de luz, para todos os tratamentos realizados (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias de germinação de sementes entre tratamentos (teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

No ensaio de sementes “frescas” (sem tempo de armazenamento), ou seja, resultante das sementes colhidas no campo e semeadas em vaso, em estufa, só as populações R06\_20 e R08\_20 germinaram e originaram plantas, que produziram uma segunda geração de sementes.

Essas populações (R06\_21 e R08\_21) que foram colhidas e colocadas em condições de germinação no mesmo dia não tiveram uma germinação média expressiva (1% e 12%, respetivamente) – Figura 17.

Estes resultados parecem ser indicadores da tendência já demonstrada em ensaios anteriores da presença de uma dormência inata das sementes “frescas”, uma vez que estas também foram ensaiadas nuas (sem lemas e páleas).

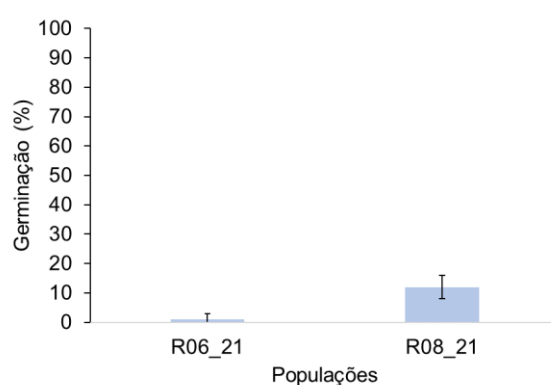


Figura 17. Germinação média das sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis* das populações R06\_21 e R08\_21, colhidas e semeadas no próprio dia, sem qualquer tratamento (n=100 sementes/tratamento). Barras de erro representam o erro padrão da média. As diferenças entre médias são significativas entre as populações (t de Student;  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3 Curvas de germinação

Os resultados do tratamento misto de estratificação por frio húmido e punção foram os que permitiram obter melhores resultados de germinação. Desse modo procurou-se conhecer a evolução da germinação ao longo do tempo e obter curvas de germinação para as populações estudadas.

Obtiveram-se assim 11 curvas de germinação, exceto para a população R04\_20 que não germinou (Figura 18 e Figura 19).

Destes resultados, o ajustamento ao modelo não linear Weibull nem sempre foi adequado, excluindo-se as populações R02\_20, R05\_20 e R07\_20.

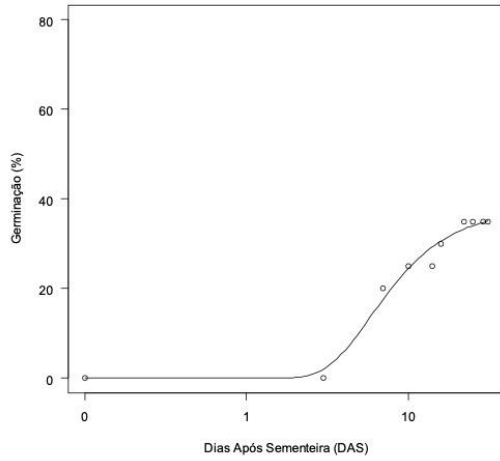
O modelo Weibull permitiu estimar os parâmetros: germinação máxima (a), tempo até se atingir 63,21% de germinação (b) e velocidade de germinação (c) nas populações R03\_20 e M14\_20. Nestas populações, que seguem a típica curva de germinação, denota-se uma tendência para a germinação máxima ser atingida aproximadamente aos 15 dias após sementeira.

Em todo o caso, para todas as curvas de germinação, pode-se afirmar que o período de latência, tempo até à ocorrência das primeiras germinações, estará entre os 3 e os 7 dias após sementeira. Nas condições ensaiadas não se fizeram observações antes de três dias.

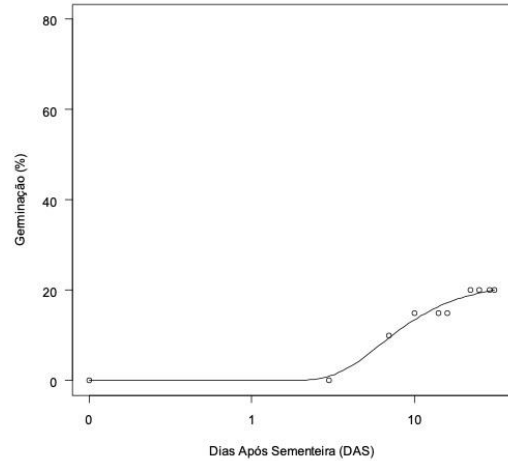
Quanto ao tipo de dormência existente nas sementes da espécie em estudo temos uma situação em que as sementes aparentam estar impermeáveis à água, o que, segundo Kildisheva *et al.* (2020) pode indicar a necessidade de monitorizar a germinação após a escarificação para classificar as sementes como tendo dormência física ou dormência combinada/mista. As sementes fisicamente dormentes germinam rapidamente e em quantidade após a escarificação. Se a germinação for baixa mesmo após a escarificação, isto implica um fraco potencial de crescimento do embrião induzido pela dormência fisiológica; tais sementes têm dormência combinada (física + fisiológica).

Os mesmos autores (Kildisheva *et al.*, 2020) referem que em sementes capazes de absorver água, mas com fraca germinação, há necessidade de avaliar o desenvolvimento do embrião, uma vez que se estiver totalmente desenvolvido e/ou diferenciado, pode indicar a tal dormência fisiológica, típica desta família botânica.

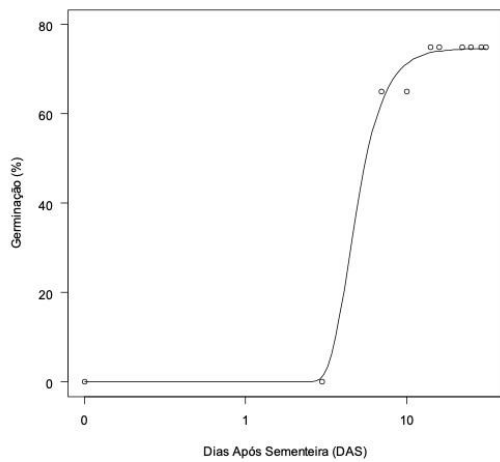
Serão necessários mais estudos, nomeadamente no que refere à escarificação química, como já mencionado, para compreender e avaliar esta situação. No entanto, os resultados não corroboram os estudos de Baskin *et al.* (1999), quando estes defendem que as sementes de *L. fusca* podem sair de dormência enquanto estão imersas. Partindo do princípio que a subespécie *L. fusca* subsp. *fascicularis* teria um comportamento semelhante à sua espécie. Nas populações cuja análise estatística foi significativa (todas, exceto R02\_20, R05\_20 e R07\_20) não houve relação entre a velocidade para se atingir 50% de germinação e a população que apresentou a maior percentagem de germinação.



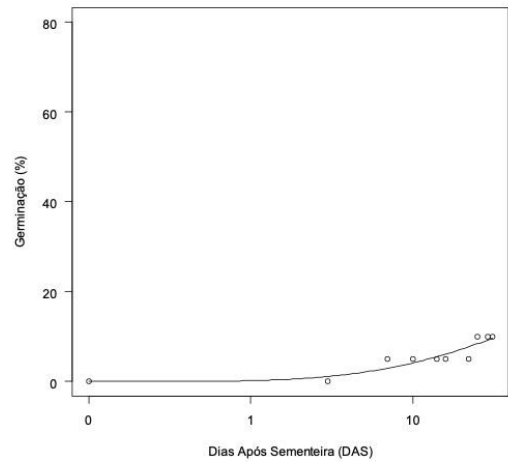
R01\_20



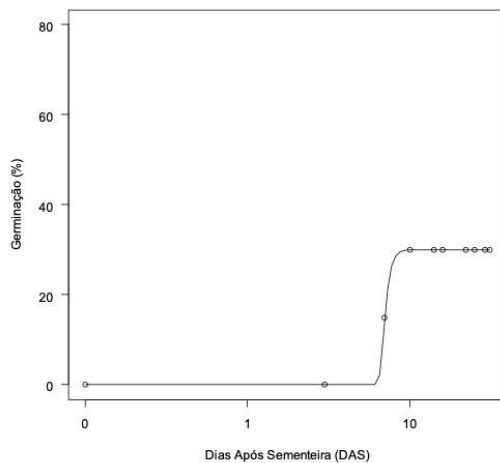
R02\_20



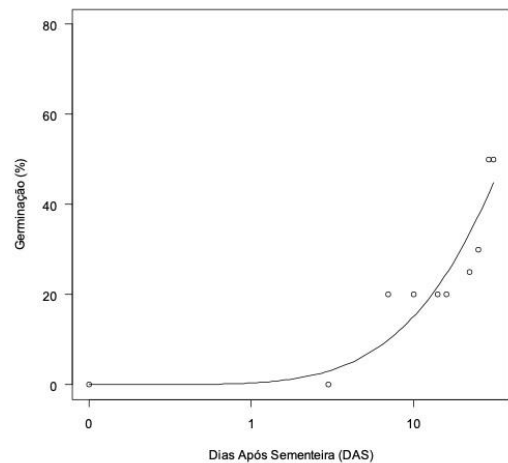
R03\_20



R05\_20

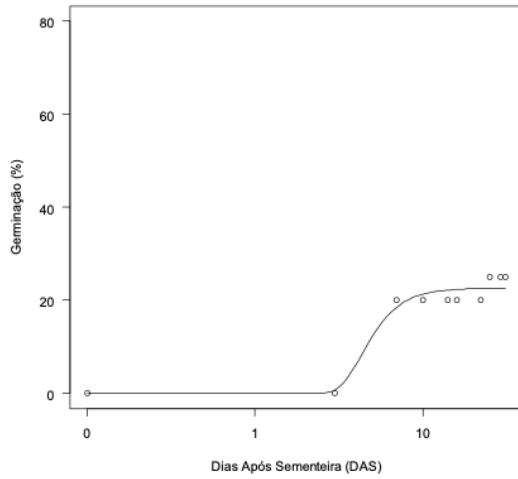


R06\_20

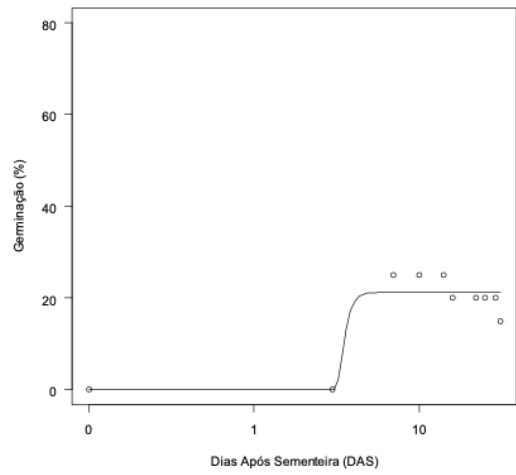


R07\_20

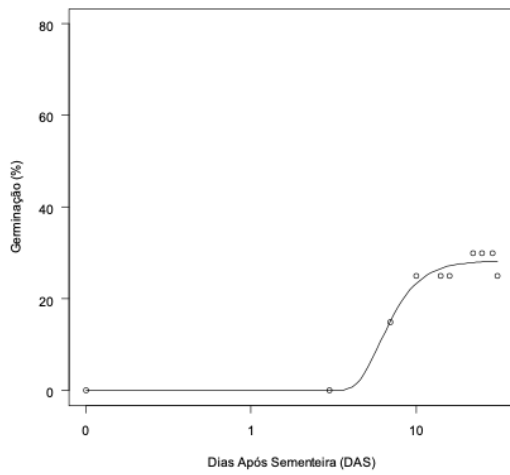
Figura 18. Curvas de germinação estimadas pelo modelo Weibull com software estatístico R para as 11 populações que germinaram no tratamento 2 (R – Ribatejo).



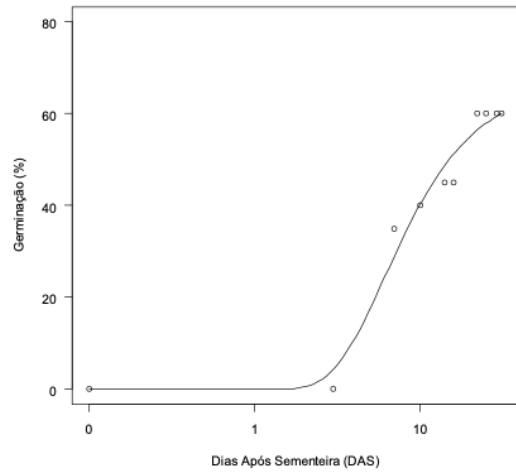
R08\_20



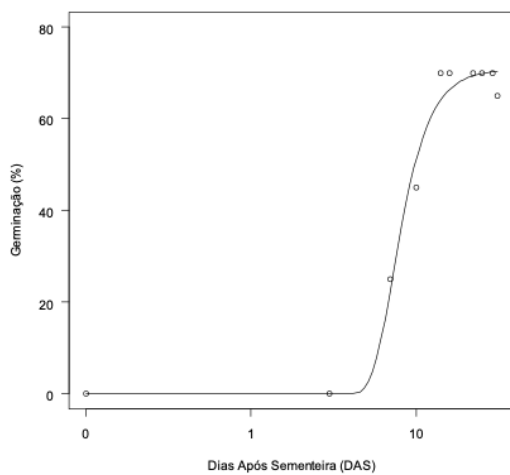
R09\_20



A10\_20



A11\_20



M14\_20

Figura 19 (continuação). Curvas de germinação estimadas pelo modelo Weibull com software estatístico R para as 11 populações que germinaram no tratamento 2 (R – Ribatejo, A – Alentejo, M – Mondego).

Os resultados dos ensaios realizados permitiram destacar dois métodos como sendo os mais eficazes para quebrar a dormência de sementes de *L. fusca* subsp. *fascicularis*: estratificação por frio húmido com punção e a escarificação química. No entanto, torna-se necessário apurar as especificidades destes dois métodos, aumentando o número de sementes em análise (50), assim como o número de repetições (2) e proceder a maior frequência nas observações.

É ainda fundamental, proceder ao teste do tetrazólio para confirmar a viabilidade das sementes da população R04\_20 que não germinou em nenhum dos tratamentos.

## **4.2 Ensaios de confirmação de resistência em *Cyperus difformis***

São apresentados resultados para as duas substâncias ativas em estudo. Para a bentazona são apresentados os resultados dos ensaios 1, 2, 3 e 5 e para o penoxsulame são apresentados os resultados dos ensaios 2, 3 e 5. No ensaio 4, as sementes não germinaram, pelo que não são apresentados resultados.

### **4.2.1 Ensaios de avaliação de resistência à bentazona**

Na Figura 20 observa-se a resposta da população A12\_20 a diferentes concentrações de bentazona (Ensaio 1). Nesta população as plântulas de *C. difformis* não foram afetadas por nenhuma das concentrações, exceto a de 10 mg.L<sup>-1</sup> que provocou 100% de mortalidade.

O ensaio 2 não foi considerado válido para as populações A07\_19 e A10\_19, por apresentarem sintomas nas testemunhas (Anexo 4). No entanto, na Figura 21 observa-se, no mesmo ensaio, a resposta da população R09\_19 a diferentes concentrações de bentazona e onde se pode observar uma percentagem próxima da mortalidade total para a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que para 1 mg.L<sup>-1</sup> existe uma percentagem próxima dos 40% de sintomas de fitotoxicidade.

No Ensaio 3 procurou-se alargar a gama de respostas aumentando as concentrações acima de 0,1 mg.L<sup>-1</sup>. Na Figura 22 é possível observar a resposta da população A12\_20 ao aumento das concentrações e, à semelhança do ensaio 1, a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> provoca 100% de mortalidade. As restantes concentrações não provocaram sintomas de fitotoxicidade ou afetaram apenas 10% das plantas (0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 5 mg.L<sup>-1</sup>).

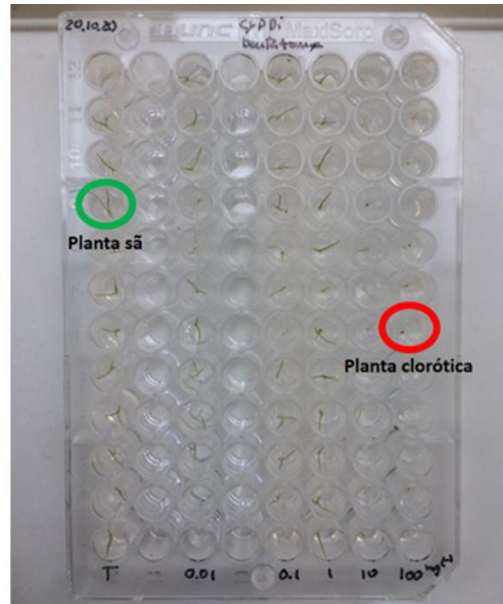
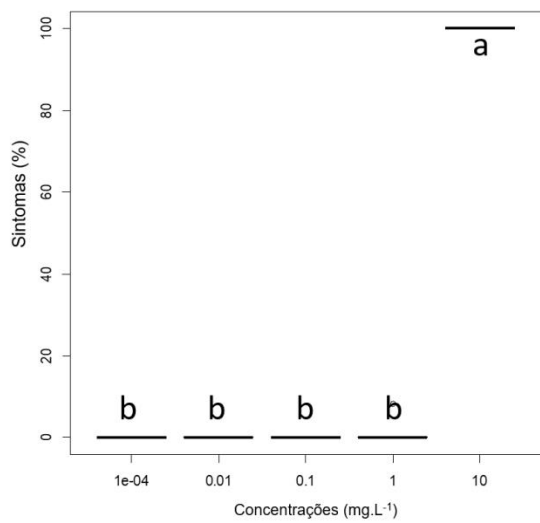


Figura 20. Efeito da bentazona numa população de *Cyperus difformis* (A12\_20) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) – dir. e por observação visual – esq (n=12/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica,  $p < 0,05$ ) (original de João Santos).

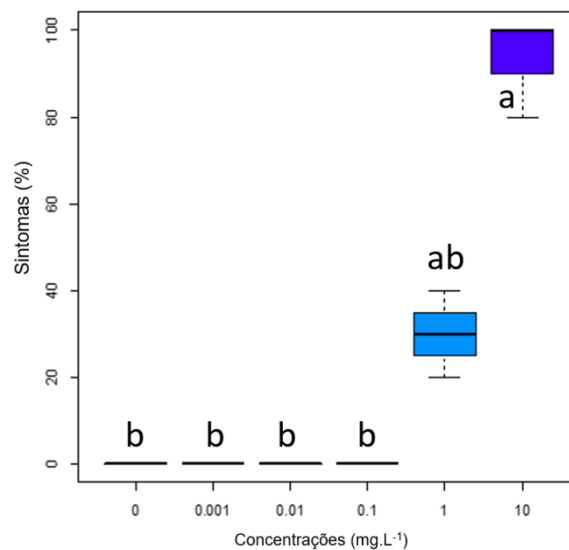


Figura 21. Efeito da bentazona numa população de *Cyperus difformis* (R09\_19) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração) Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica,  $p < 0,05$ ).

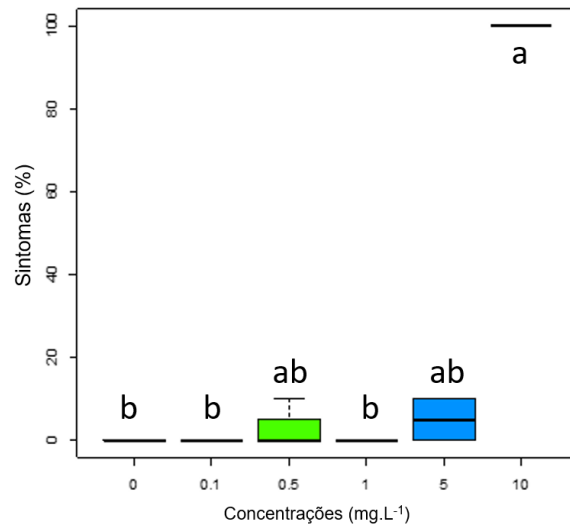


Figura 22. Efeito da bentazona numa população de *Cyperus difformis* (A12\_20) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica, p<0,05).

No ensaio 5, é possível comparar todas as populações “referência” (A07\_19, A10\_19 e R09\_19) com a população de interesse (A12\_20). Em todas as populações, a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> provoca 100% de mortalidade de plântulas (Figura 23).

A concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>, foi a primeira a provocar sintomas em todas as populações “referência”, indicando que poderá ser fator discriminante entre elas. A população A10\_19 ao apresentar sintomatologia na testemunha, torna a comparação presente na Figura 24 não interpretável.

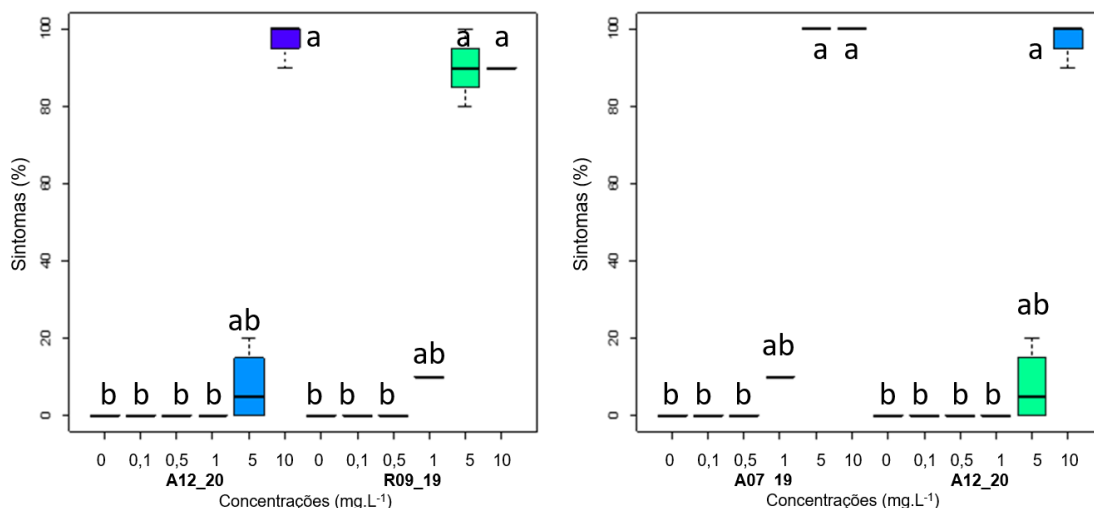


Figura 23. Efeito da bentazona em três populações de *Cyperus difformis* (A12\_20 e R09\_19 – esq., A07\_19 e A12\_20 – dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica, p<0,05).



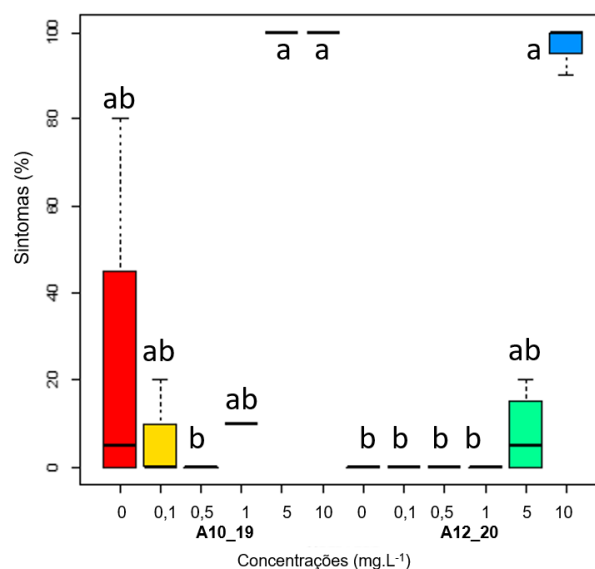


Figura 24. Efeito da bentazona em duas populações de *Cyperus difformis* (A10\_19 e A12\_20) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica, p<0,05).

#### 4.2.2 Ensaios de avaliação de resistência ao penoxsulame

Na Figura 25 ilustram-se as respostas de diferentes populações ao penoxsulame, referentes ao ensaio 2.

Na população A07\_19 as plântulas de *C. difformis* não foram afetadas por nenhuma das concentrações, exceto a de 10 mg.L<sup>-1</sup> que provocou 100% de mortalidade.

Na população A10\_19 as concentrações de 0,001 mg.L<sup>-1</sup> a 0,01 mg.L<sup>-1</sup> não provocaram sintomas nas plântulas de *C. difformis* que se comportaram como a Testemunha. A concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> provocou 70-90% de mortalidade e a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> provocou 100% de mortalidade como a população anterior.

Na população R09\_19 o comportamento foi semelhante ao da população A07\_19, embora tenha havido mais variabilidade nos resultados. No entanto, como a testemunha apresentou sintomas, o resultado não foi considerado válido (Anexo 4).

Neste ensaio pode-se concluir que a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> provoca a mortalidade em todas as populações, mas não foi possível obter uma concentração discriminatória entre populações.

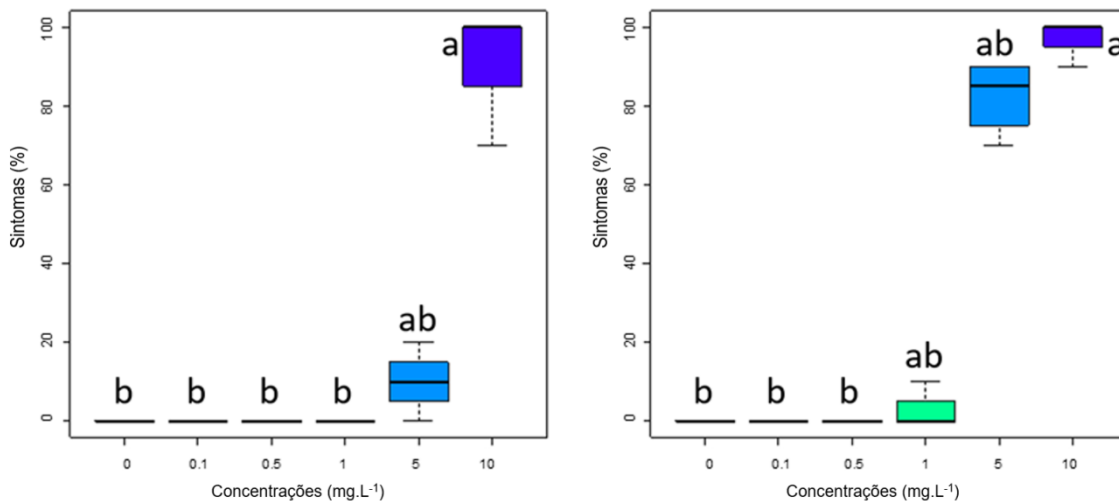


Figura 25. Efeito do penoxsulame em duas populações de *Cyperus difformis* (A07\_19 - esq. e A10\_19 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre modalidades (teste de Dunn, estatística não paramétrica, p<0,05).

O ensaio 3 não foi considerado válido, por apresentar sintomas na testemunha e na resposta de cada população ao aumento de concentração de penoxsulame (Anexo 4).

Nas figuras seguintes (Figura 26 e Figura 27) registou-se a resposta das quatro populações estudadas ao penoxsulame, referentes ao ensaio 5.

A concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>, provocou 95% de mortalidade na população A07\_19, tendência semelhante às restantes populações. A concentração 5 mg.L<sup>-1</sup> originou sintomas em 20-30% das plântulas. A concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, foi responsável por sintomas em 10-30% das plântulas, possivelmente devido a erro de concentração ou contaminação.

Na população A10\_19 há uma tendência muito semelhante à anterior, apesar de maior percentagem de plântulas com sintomas para a concentração máxima.

Na população R09\_19 registou-se 100% de mortalidade para as concentrações de 5 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup>, o que poderá indicar que existe maior sensibilidade desta população, face às outras.

Na população A12\_20 para a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> de penoxsulame, as plântulas não apresentaram sintomatologia ao contrário das restantes.

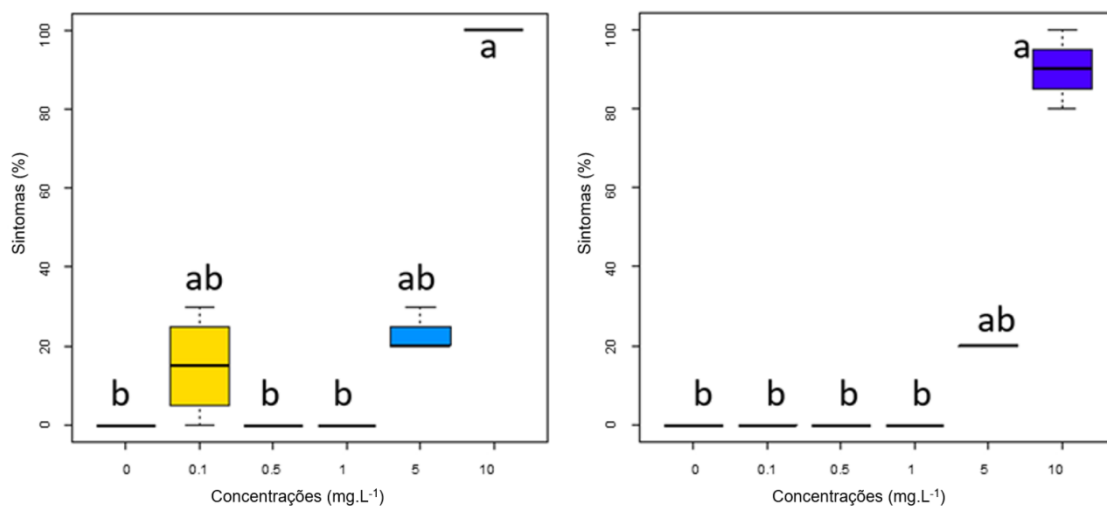


Figura 26. Efeito do penoxsulame em duas populações de *Cyperus difformis* (A07\_19 - esq. e A10\_19 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica, p<0,05).

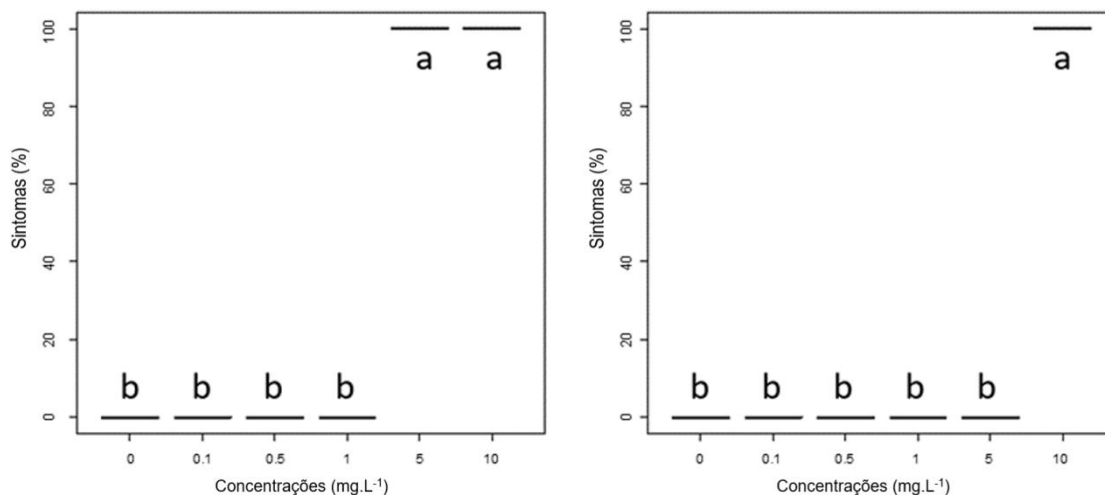


Figura 27. Efeito do penoxsulame em duas populações de *Cyperus difformis* (R09\_19 - esq. e A12\_20 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100%, plantas mortas) (n= 40/concentração). Letras diferentes indicam diferenças significativas das médias entre tratamentos (teste de Dunn, estatística não paramétrica, p<0,05).

A população A10\_20 apresentou, em todos os ensaios, sintomas na testemunha, fruto de se estar a avaliar uma escala de sintomas e não apenas a morte ou sobrevivência das plantas, não sendo provocados pelo herbicida. Esta população, que serviu de referência para a sensibilidade aos herbicidas não dá confiança nos resultados apresentados, pelo que deve ser descartada em trabalhos futuros.

As populações A07\_19 e A10\_19 são resistentes ao penoxsulame e sensíveis à bentazona corroborando a informação apresentada na revisão bibliográfica da existência de resistência desta espécie aos inibidores da ALS e não havendo referência à existência de resistências aos inibidores da fotossíntese no fotossistema II. São

salvaguardadas as considerações já realizadas sobre a população A10\_19, acima referidas.

A população R09\_19 apresentou nos ensaios com resultados válidos uma tendência para a sensibilidade às duas substâncias ativas. Eventualmente esta situação pode dever-se a uma situação regional, que é distinta no Ribatejo (Tejo) face às amostras provenientes de Alcácer do Sal (Sado).

A população A12\_20 aparenta ter resistência cruzada às duas substâncias ativas o que explicaria o elevado grau de infestação observado no campo. É por isso a primeira população conhecida de *C. difformis* resistente a herbicidas, em Portugal. Não havendo nenhuma referência a resistências cruzadas com a bentazona, é uma situação que merece mais investigação, nomeadamente com outro tipo de ensaios, com planta inteira em vaso, conduzidos em condições mais aproximadas às de campo de modo a confirmar esta suspeita.

Esta situação, apesar de demonstrar que houve uma rotatividade de modos de ação das opções químicas na gestão de infestantes na cultura do arroz, traduz o rápido esgotamento das mesmas, pelo uso, muitas vezes desadequado. Deve-se por esse motivo, procurar outras opções não-químicas, respeitando os princípios da proteção integrada, nomeadamente medidas culturais (rotação de culturas, culturas de cobertura ou falsa sementeira) ou biológicas, de modo que, futuramente, não se esgotem rapidamente todas as opções mais seletivas e eficazes para esse efeito.

## 5. Conclusões

As sementes de *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* (Poaceae) das 12 populações estudadas e com diferentes proveniências (Baixo Mondego, Ribatejo e Alentejo), não germinaram sem tratamento de quebra de dormência.

A desinfecção das sementes de leptocloa foi eficaz conjugando 20 min de hipoclorito de sódio (4%) e 20 min de etanol (70%), com agitação.

O método mais eficiente de quebra de dormência, entre os estudados, foi o tratamento misto de estratificação húmida durante cinco meses a 3 °C, na obscuridade, seguida de punção. Este resultado é indicativo de possível dormência combinada desta subespécie, isto é, além da dormência fisiológica comum das plantas da família Poaceae, também apresenta dormência física.

O período de latência das sementes variou entre 3 e 7 dias em condições de germinação de alternância de temperaturas e luz 23/18 °C (16 h de luz). Obteve-se uma percentagem de germinação entre 10% e 75%. Tanto a maior como a menor capacidade germinativa ocorreram em populações de sementes da bacia hidrográfica do Tejo. Uma população desta região não germinou o que poderá ser devido à falta de maturidade das sementes na altura da colheita.

Este trabalho permitiu ultrapassar a dormência de sementes, fator limitante para a obtenção de plântulas em quantidade suficiente para ensaios de resistência. Para confirmação da avaliação de resistência adquirida é necessário prosseguir os ensaios de dose-resposta para confirmar a resistência a herbicidas inibidores de ACCase em *L. fusca* subsp. *fascicularis*.

A população de *Cyperus difformis* proveniente da bacia hidrográfica do Sado, colhida em 2020, foi confirmada como resistente à bentazona e apresentou resistência cruzada ao penoxsulame, substância ativa com modo de ação diferente da bentazona. A concentração discriminatória para a bentazona e penoxsulame, que permitiu distinguir populações sensíveis de resistentes, foi de 5 mg.L<sup>-1</sup> para ambas as substâncias ativas.

Foi detetada pela primeira vez em Portugal uma população de *C. difformis* resistente a herbicidas, designadamente bentazona e penoxsulame. É necessário validar os resultados obtidos em *C. difformis* com métodos expeditos, com ensaios com planta inteira em vaso, conduzidos em condições mais aproximadas às de campo.

Trabalhos futuros deverão analisar se a resistência cruzada que se identificou entre a bentazona (HRAC 6) e o penoxsulame (HRAC 2) poderá ser atribuída a resistência metabólica ou resistência múltipla.

Estes resultados devem ser encarados com uma urgência na aplicação dos princípios da proteção integrada à gestão de infestantes na cultura do arroz. Não só com a alternância de modos de ação das opções químicas, mas também a introdução de opções genéticas (melhoramento), mecânicas ou outras que permitam uma agricultura sustentável a nível ambiental e a nível técnico.

## 6. Referências bibliográficas

- Abu-Elsaoud, A., & Qari, S. (2017). Influence of microwave irradiations on germination, seedling growth and electrolyte leakage of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 16(1): 11-24.
- Adkins, S., Bellairs, S. & Loch, D. (2002). Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica*, 126: 13–20.
- Almeida, A., Marques, P., Jordão, A., Silva, C., Coutinho, J., Palha, L., & Maças, B. (2021). Melhoramento genético do arroz em Portugal – principais resultados das atividades desenvolvidas em 2020. *Vida Rural*, 1865(68): 60-67.
- Altop, E. K., Mennan, H., Phillippo, C. J., & Zandstra, B. H. (2015). Effect of the burial depth and environmental factors on the seasonal germination of bearded sprangletop (*Leptochloa fusca* [L.] Kunth ssp. *fascicularis* [Lam.] N. Snow). *Weed Biology and Management*, 15(4): 147-158.
- Arcieri, M., & Ghinassi, G. (2020). Rice cultivation in Italy under the threat of climatic change: Trends, technologies and research gaps. *Irrigation and Drainage*, 69(4): 517-530.
- Arnhold, E. (2013). Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 6(50): 488-492.
- Ávila, M. R., Barbosa, J., Fonseca, N. D. S., Nagashima, G. T., & Oliveira, C. M. G. D. (2019). Weibull distribution and dynamics of germination of Rangpur lime seeds at different temperatures. *Journal of Seed Science*, 41: 328-335.
- Barreda, D., Pardo, G., Osca, J. M., Catala-Forner, M., Consola, S., Garnica, I., López-Martínez, N., Palmerín, J., & Osuna, M. D. (2021). An Overview of Rice Cultivation in Spain and the Management of Herbicide-Resistant Weeds. *Agronomy*, 11(6): 1095.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2001). *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego. 666 pp.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M., & Chester, E. W. (1999). Seed germination ecology of the annual grass *Leptochloa panicea* ssp. *mucronata* and a comparison with *L. panicoides* and *L. fusca*. *Acta Oecologica*, 20(5): 571-577.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (1985). The annual dormancy cycle in buried weed seeds: a continuum. *BioScience*, 35(8): 492-498.

- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1): 1-16.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2020). Breaking seed dormancy during dry storage: a useful tool or major problem for successful restoration via direct seeding?. *Plants*, 9(5): 636.
- Beckie, H. J., Busi, R., Lopez-Ruiz, F. J., & Umina, P. A. (2021). Herbicide resistance management strategies: how do they compare with those for insecticides, fungicides and antibiotics?. *Pest Management Science*, 77: 3049–3056.
- Beckie, H. J., Heap, I. M., Smeda, R. J., & Hall, L. M. (2000). Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology*, 14(2): 428-445.
- Benvenuti, S., Dinelli, G., & Bonetti, A. (2004). Germination ecology of *Leptochloa chinensis*: A new weed in the Italian rice agro-environment. *Weed Research*, 44: 87 - 96.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9(7): 1055-1066.
- Bian, L., Yang, L., Wang, J. A., & Shen, H. L. (2013). Effects of KNO<sub>3</sub> pretreatment and temperature on seed germination of *Sorbus pohuashanensis*. *Journal of Forestry Research*, 24(2): 309-316.
- Boddy, L. G., Bradford, K. J., & Fischer, A. J. (2013). Stratification requirements for seed dormancy alleviation in a wetland weed. *PLOS ONE*, 8(9): e71457.
- Bozal, J. M., Garnica, I., Lezaun, J. A., & Peralta, Y. J. (2011). Una nueva mala hierba en los arrozales de Navarra. *IT Agrícola*, 3: 28.
- Brown, R. F., & Mayer, D. G. (1988). Representing cumulative germination. 2. The use of the Weibull function and other empirically derived curves. *Annals of Botany*, 61(2): 127-138.
- Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C., Davis, V. M., Shaner, D., Norsworthy, J. K., & Ritz, C. (2013). Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science*, 61(1): 4-20.
- Busi, R., Vidotto, F., Fischer, A. J., Osuna, M. D., De Prado, R., & Ferrero, A. (2006). Patterns of resistance to ALS herbicides in smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis*) and ricefield bulrush (*Schoenoplectus mucronatus*). *Weed Technology*, 20(4): 1004-1014.



- Caixinhas, M. L. C. (1988). Aspectos ecológicos da germinação de sementes de infestantes. *Tese de Doutoramento em Biologia*, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Calha, I., Machado, C., & Rocha, F. (1999) Resistance of *Alisma plantago-aquatica* to sulfonyleurea herbicides in portuguese rice fields. *Hydrobiologia*, 415: 289–293.
- Canha, G. (2012). O combate às infestantes do arroz em Portugal. *Agrotec*, 4: 76-77.
- Canha, G. (2013). 10 passos para o sucesso dos herbicidas no arroz. *Agrotec*, 6: 50-51.
- Caton, A. (2020). *España – Datos de producción de campaña arroz 2020/2021*. Cooperativas Agro-alimentarias de España. 25 pp.
- Chauhan, B. S., & Johnson, D. E. (2008). Germination ecology of Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis*) in the Philippines. *Weed Science*, 56(6): 820-825.
- Chauhan, B. S. (2020). Grand challenges in weed management. *Frontiers in Agronomy*, 1: 3.
- Coutinho, A. X. P. (1913). *Flora de Portugal*. 1ª edição. Aillaud, Alves & Cia Lisboa Livraria Bertrand. 766 pp.
- Darrudi, R., Hassandokht, M. R., & Nazeri, V. (2015). Effects of moist stratification, GA<sub>3</sub> and seed age on seed germination of *Rheum khorasanicum* B. Baradaran & A. Jafari. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4): 168-173.
- Daszkowska-Golec, A. (2011). *Arabidopsis* seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormones. *Omic: A Journal of Integrative Biology*, 15(11): 763-774.
- Délye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C. W., & Tranel, P. J. (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science*, 63(SP1): 91-115.
- Derakhshan, A., & Gherekhloo, J. (2013). Factors affecting *Cyperus difformis* seed germination and seedling emergence. *Planta Daninha*, 31: 823-832.
- Devesa, J. A., Alcaraz, J. A. D., Tellez, T., Benítez, M., Olivencia, A., Molina, R., & Claver, J (1991). *Las gramíneas de Extremadura*. Badajoz, Universidad de Extremadura, Servicio de Publicaciones. 358 pp.
- DGAV (2022). Listagem de produtos fitofarmacêuticos com autorização de venda em Portugal [<https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2022/02/Listagem-de-PF-07-02-2022.xls>]. Acedido em 13 de fevereiro de 2022.

- Dias, M., Pacheco, P., Vasconcelos, T., Lima, A., Forte, P., Canha, G., Setas, F., Calha, I., & Monteiro, A. (2020). Gestão das infestantes do arroz. *Agrotec – Grandes Culturas*, 34: 75-78.
- Dorado, J., Fernández-Quintanilla, C., & Grundy, A. C. (2009). Germination patterns in naturally chilled and nonchilled seeds of fierce thornapple (*Datura ferox*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Science*, 57(2): 155-162.
- Driver, K., Al-Khatib, K., & Godar, A. (2020<sup>a</sup>). Bearded sprangletop (*Diplachne fusca* ssp. *fascicularis*) flooding tolerance in California rice. *Weed Technology*, 34(2): 193-196.
- Driver, K. E., Brunharo, C. A., & Al-Khatib, K. (2020<sup>b</sup>). Mechanism of clomazone resistance in *Leptochloa fusca* spp. *fascicularis* to clomazone. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162: 1-5.
- Dunn, O.J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6: 241-252.
- EPPO (2021). EPPO Global Database [<https://gd.eppo.int>]. Acedido em 22 de outubro de 2021.
- Ferrero, A., & Vidotto, F. (2007). Weeds and weed management in Italian rice fields. *Agroeconomical traits of rice cultivation in Europe and India*. Edizioni Mercurio Srl, Research Book. Europe-India Economic Cross Cultural Programme" Rice Net"(EU-India Rice Districts Network Promotion through Agro-Economical, Cross Cultural, and Technical Actions"), Vercelli-Italy. 286 pp.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30): 10307-10330.
- Gianinetti, A., Laarhoven, L. J., Persijn, S. T., Harren, F. J., & Petruzzelli, L. (2007). Ethylene production is associated with germination but not seed dormancy in red rice. *Annals of Botany*, 99(4): 735-745.
- GPP (2019). Arroz [[https://www.gpp.pt/images/globalagrimar/estrategias/Arroz\\_FichProdEstrat\\_2019.pdf](https://www.gpp.pt/images/globalagrimar/estrategias/Arroz_FichProdEstrat_2019.pdf)]. Acedido em 18 de março de 2021.
- Hakim, M. A., Juraimi, A. S., Karim, S. M., Khan, M. S. I., Islam, M. S., Choudhury, M. K., Soufan, W., Alharby, H., Bamagoos, A., Iqbal, M., Hnilicka, F., Kubes, J., Rahman, M., Saud, S., Hassan, M., & Sabagh, A. (2021). Effectiveness of herbicide to control rice weeds in diverse saline environments. *Sustainability*, 13(4): 2053.

- Heap, J., & Knight, R. (1982). A population of ryegrass tolerant to the herbicide diclofop-methyl [in South Australia]. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science (Australia)*, 48: 156–157.
- Heap, I. M. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science*, 51(3): 235-243.
- Heap, I. (2021). The International Herbicide-Resistant Weed Database [https://www.weedscience.org]. Acedido em 20 de outubro de 2021.
- INE (2021). Estatísticas Agrícolas – 2020 [https://www.ine.pt/xurl/pub/437147278]. Acedido em 18 de março de 2021.
- Inglis, G. J., & Waycott, M. (2001). Methods for assessing seagrass seed ecology and population genetics. *Global Seagrass Research Methods*, 1: 123-141.
- Jin, M., Chen, L., Deng, X. W., & Tang, X. (2021). Development of herbicide resistance genes and their application in rice. *The Crop Journal*, [https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.05.007].
- Kaloumenos, N. S., Chatzilaridou, S. L., Mylona, P. V., Polidoros, A. N., & Eleftherohorinos, I. G. (2013). Target-site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing.). *Pest Management Science*, 69(7): 865-873.
- Kildisheva, O. A., Dixon, K. W., Silveira, F. A., Chapman, T., Di Sacco, A., Mondoni, A., Turner, S. & Cross, A. T. (2020). Dormancy and germination: making every seed count in restoration. *Restoration Ecology*, 28: S256-S265.
- Kraehmer, H., Jabran, K., Mennan, H., & Chauhan, B. S. (2016). Global distribution of rice weeds – a review. *Crop Protection*, 80: 73-86.
- Lima, A. (1997). Current situation of rice production in Portugal. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 15(3): 29-40.
- Lindsey III, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2017). Standardized method for high-throughput sterilization of *Arabidopsis* seeds. *Journal of Visualized Experiments*, 128: e56587.
- Llenes, J. M., Cónsola, S., Montull-Daniel, J. M., & Taberner-Palou, A. (2020). Experiencia en el control de malas hierbas invasoras en Cataluña desde el punto de vista de su gestión. *Información Técnica Económica Agraria*, 3(116): 256-275.

- Luzes, D. (1990). Nivelamento do solo e sementeira na cultura do arroz. *Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Macías, A. B., Esteban, M. G., & Pardo, F. M. V. (2011). Aproximación al conocimiento de la flora neófito en la cuenca del Guadiana Internacional a su paso por Extremadura (España) Alentejo (Portugal). *Folia Botanica Extremadurensis*, 5: 5-20.
- MacLaren, C., Storkey, J., Menegat, A., Metcalfe, H., & Dehnen-Schmutz, K. (2020). An ecological future for weed science to sustain crop production and the environment. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 40(4): 1-29.
- Mahajan, G., Mutti, N. K., Jha, P., Walsh, M., & Chauhan, B. S. (2018). Evaluation of dormancy breaking methods for enhanced germination in four biotypes of *Brassica tournefortii*. *Scientific Reports*, 8(1): 1-8.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C., & Dial, M. J. (1990). Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, 4(1): 163-168.
- Márquez, T. (1999). Nuevas especies de malas hierbas en el cultivo del arroz en España. *Vida Rural*, 86: 26-29.
- Mascanzoni, E., Perego, A., Marchi, N., Scarabel, L., Panozzo, S., Ferrero, A., Acutis, M., & Sattin, M. (2018). Epidemiology and agronomic predictors of herbicide resistance in rice at a large scale. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(6): 1-10.
- Matilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2: 549.
- Matzrafi, M., Peleg, Z., & Lati, R. (2021). Herbicide Resistance in Weed Management. *Agronomy*, 11: 280.
- McIntyre, S., Mitchell, D. S., & Ladiges, P. Y. (1989). Germination and seedling emergence in *Diplachne fusca*: a semi-aquatic weed of rice fields. *Journal of Applied Ecology*, 26: 551-562.
- Messelhäuser, M. H., Linn, A. I., Mathes, A., Sievernich, B., & Gerhards, R. (2021). Development of an agar bioassay sensitivity test in *Alopecurus myosuroides* for the pre-emergence herbicides cinmethylin and flufenacet. *Agronomy*, 11(7): 1408.

- Michel, B. E., & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5): 914-916.
- Monte, J. P., & Cortés, J. A. (2000). Acerca de las especies del género *Leptochloa*, como malas hierbas de los arrozales y su distribución en España. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas*, 26: 599-604.
- Moss, S. R. (1995). Techniques for determining herbicide resistance. *Brighton Crop Protection Conference Weeds*, 2: 547-556.
- Moss, S. R., Albertini, A., Arlt, K., Blair, A., Collings, L., Bulcke, R., Eelen, H., Claude, J. P., Cordingley, M., Murfitt, R., & Cornes, D. (1998). Screening for herbicide resistance in black-grass (*Alopecurus myosuroides*): a "ring" test. *50th International Symposium on Crop Protection*, 50: 671-679.
- Nandan, R., Singh, V., Kumar, V., Singh, S. S., Hazra, K. K., Nath, C. P., Malik, R. K., & Poonia, S. P. (2020). Viable weed seed density and diversity in soil and crop productivity under conservation agriculture practices in rice-based cropping systems. *Crop Protection*, 136: 105210.
- Nieto, J. H., Brondo, M. A., & Gonzalez, J. T. (1968). Critical periods of the crop growth cycle for competition from weeds. *P. A. N. S.*, 14(2): 159-166.
- Nunes, J., & Silva D. (1996). O mercado de produtos fitofarmacêuticos. *Simpósio Protecção das Plantas, Agricultura e Ambiente*. ANIPLA. Oeiras: 69-80.
- Oliveira, D. J. M. (2016). Monitorização da vegetação infestante em arrozais e prospeção de resistência a herbicidas em *Echinochloa* spp. *Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Oliveira, F., Reis, P., Oliveira, S., Jordão, A., Russo, A., Damásio, H., Eugénio, R., Paixão, J., Melo, F., Nunes, M., Teixeira, M., Bahcevandzиеv, K., & Gonçalves, J. (2019). Sustainability of rice production systems: agro-economic analysis of Baixo Mondego and Lis irrigation districts, Portugal. Em *X International Agriculture Symposium* (pp: 1210-1215). Sarajevo, Bósnia e Herzegovina.
- Osca, J. (2013). Expansion of *Leptochloa fusca* ssp. *uninervia* and *Leptochloa fusca* ssp. *fascicularis* in rice fields in Valencia, eastern Spain. *Weed Research*, 53: 479–488.
- Osca, J. M., Galán, F., & Moreno-Ramón, H. (2021). Rice Paddy Soil Seedbanks Composition in a Mediterranean Wetland and the Influence of Winter Flooding. *Agronomy*, 11(6): 1199.

- Osuna, M. D., Vidotto, F., Fischer, A. J., Bayer, D. E., De Prado, R., & Ferrero, A. (2002). Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 73(1): 9-17.
- Pacheco, P. V. M. (2015). Gestão das infestantes do arroz: Orivárzea-Orizicultores do Ribatejo, SA. *Relatório de Estágio*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Pastor, A. C. (2018). Ultrasound assisted hydration of grains with sigmoidal behavior: kinetics of hydration, cooking, germination and nutrient incorporation. *Tese de Doutoramento*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Pedroso, R. M., Neto, D. D., Victoria Filho, R., Fischer, A. J., & Al-Khatib, K. (2019). Modeling germination of smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis* L.) seeds from rice fields in California across suboptimal temperatures. *Weed Technology*, 33(5): 733-738.
- Peterson, M. A., Collavo, A., Ovejero, R., Shivrain, V., & Walsh, M. J. (2018). The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Management Science*, 74(10): 2246-2259.
- Pinto, A. (2015). O arroz [<http://www.agronegocios.eu/noticias/o-arroz/>]. Acedido em 24 de julho de 2021.
- Portero, M. (2011). *Producción integrada del arroz en el sur de España*. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca. 316 pp.
- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 317-347.
- R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria [<http://www.R-project.org/>]. Acedido em 16 de novembro de 2021.
- RAP network (2016). Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends in Plant Science*, 21(10): 834-853.
- Recasens, J., Conesa, J. A., & Juárez-Escario, A. (2020). Las invasiones vegetales en sistemas agrícolas. Retrospectiva de los últimos 40 años en Cataluña. *Informacion Tecnica Economica Agraria*, 3(116): 190-211.
- Ritz, C., Pipper, C. B., & Streibig, J. C. (2013). Analysis of germination data from agricultural experiments. *European Journal of Agronomy*, 45: 1-6.

- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PLOS ONE*, 10(12): e0146021.
- Rodríguez, J. (2017). Control de *Leptochloa* en arrozales de la Albufera valenciana. *Tese de Mestrado*, Universitat Politècnica de València, València, Espanha.
- Romani, M., & Tabacchi, M. (2000). *Leptochloa fascicularis* nuova infestante del riso. *Informatore Agrario*, 56(36): 65-66.
- Royal Botanic Gardens Kew (2021) Seed Information Database (SID). Versão 7.1. [<http://data.kew.org/sid/>]. Acedido em 12 novembro 2021.
- Ruiz-Santaella, J. P., Bakkaliu, Y., Osuna, M. D., & De Prado, R. (2004). Evaluation of resistance in *Cyperus difformis* populations to ALS inhibiting herbicides. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(3): 91-96.
- Sanders, B. A. (1994). The life cycle and ecology of *Cyperus difformis* (rice weed) in temperate Australia: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 34(7): 1031-1038.
- Scarabel, L.; Bero, D., & Sattin, M. (2003). Dormancy breaking and germination of *Alisma plantago-aquatica* and *Scirpus mucronatus*. *Aspects of Applied Biology -Seed Banks: Determination, Dynamics and Management*, 69: 285-292.
- Shekhawat, K., Rathore, S. S., & Chauhan, B. S. (2020). Weed management in dry direct-seeded rice: A review on challenges and opportunities for sustainable rice production. *Agronomy*, 10(9): 1264.
- Silva, A. & Faísca, C. (2015). A orizicultura em Ponte de Sor. Economia e Saúde Pública (1850-1950). *Abeliterivm*, 1(2): 107-120.
- Smith, R. J. (1983). Competition of bearded sprangletop (*Leptochloa fascicularis*) with rice (*Oryza sativa*). *Weed Science*, 31(1): 120-123.
- Smith, R. J. (1988). Weed thresholds in southern US rice, *Oryza sativa*. *Weed Technology*, 2(3): 232-241.
- Snow, N., Peterson, P. M., Romaschenko, K., & Simon, B. K. (2018). Monograph of *Diplachne* (Poaceae, Chloridoideae, Cynodonteae). *PhytoKeys*, 93: 1-102.
- Sung, S., Leather, G. & Hale, M. (1987). Induction of germination in dormant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) seeds by wounding. *Weed Science*, 35(6): 753-757.

- Süveges, K., Molnár, A. V., Mesterházy, A., Tüdösné Budai, J., & Fekete, R. (2021). Emergence of a new salt-tolerant alien grass along roadsides? Occurrence of *Diplachne fusca* subsp. *fascicularis* (Poaceae) in Hungary. *Acta Botanica Croatica*, 80(2): 140-145.
- Swain, D., Nott, M., & Trounce, R. (1975). Competition between *Cyperus difformis* and rice: the effect of time of weed removal. *Weed Research*, 15: 149-152.
- Sweeney, M., & McCouch, S. (2007). The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, 100(5): 951-957.
- Taylorson, R., & Brown, M. (1977). Accelerated after-ripening for overcoming seed dormancy in grass weeds. *Weed Science*, 25(6): 473-476.
- Teles, V. (1800). *Memoria sobre a cultura do arroz e suas conquistas*. Lisboa: Officina da Casa Literária do Arco do Cego. 29 pp.
- Tian, Z., Shen, G., Yuan, G., Song, K., Lu, J., & Da, L. (2020). Effects of *Echinochloa crus-galli* and *Cyperus difformis* on yield and eco-economic thresholds of rice. *Journal of Cleaner Production*, 259: 120807.
- Vaquinhas, I. M. (1991). Um espaço em transformação: a extensão da cultura do arroz nos campos do Mondego, 1856-88. *Análise Social*, 26(112/113): 689-703.
- Vasconcellos, J. C. (1953). *O arroz: estudo botânico* (No. 39). Ministério da Economia, Comissão Reguladora do Comércio de Arroz. 301 pp.
- Vasconcelos, T., & Forte, P. (1999). Weeds in the rice fields of Sado Valley. Em *Congresso 1999: Sociedad Española de Malherbologia: actas* (pp: 195-204). Logroño, Espanha.
- Vasconcelos, T., Tavares, M. & Gaspar, N. (1999). Infestantes introduzidas nos arrozais do Baixo Tejo e Baixo Sorraia. *Jornadas do Ambiente e Qualidade* (pp: 207-216). Santarém, Portugal.
- Vasconcelos, T., Monteiro, A., Lima, A., & Forte, P. (2020). *Infestantes de arrozais de Portugal*. 1ª Edição. ISAPress, Lisboa. 164 pp.
- Vianna e Silva, M. (1969). *Arroz*. 1.ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 454 pp.
- Vidotto, F. (2017). Reduction of the weed seed bank in the soil as a management strategy. Em *X Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado* (pp: 1-12). Gramado, Brasil.



- Vidotto, F., Letey, M., & Ferrero A. (2011). La gestione integrata delle malerbe: un vincolo o una opportunità per una produzione economicamente e ambientalmente sostenibile?. Em Atti del XVIII convegno S.I.R.F.I. (pp: 169). Bolonha, Itália.
- Walters, D., & C. Southwick (2018). Table Grape Weed Disseminule ID, USDA APHIS PPQ, Bugwood.org.
- Wang, H., Liu, W., Zhao, K., Yu, H., Zhang, J., & Wang, J. (2018). Evaluation of weed control efficacy and crop safety of the new HPPD-inhibiting herbicide-QYR301. *Scientific Reports*, 8(1): 1-11.
- WCVP (2021). World Checklist of Vascular Plants, versão 2.0. [<http://wcvp.science.kew.org/>]. Acedido em 22 outubro de 2021.
- Weibull, W. (1951). A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 18(3): 293-297.
- Westwood, J. H., Charudattan, R., Duke, S. O., Fennimore, S. A., Marrone, P., Slaughter, D. C., Swanton, C., & Zollinger, R. (2018). Weed management in 2050: perspectives on the future of weed science. *Weed Science*, 66(3): 275-285.
- WSSA (1998). Technology Notes. *Weed Technology*, 12(4): 789–790.

## 7. Anexos

Anexo 1. Coordenadas geográficas dos campos de arroz onde foram colhidas as 12 amostras de populações de *Leptochloa fusca* subsp. *fascicularis* em 2020.

Zona	Parcela	Data colheita	Latitude	Longitude
BH Tejo	R01_20	08/set/20	38°57'10.7"N	8°40'17.5"W
	R02_20	08/set/20	38°57'49.9"N	8°45'21.1"W
	R03_20	14/set/20	38°59'46.6"N	8°23'56.5"W
	R04_20	14/set/20	38°59'29.5"N	8°23'49.2"W
	R05_20	14/set/20	38°56'43.4"N	8°30'18.8"W
	R06_20	14/set/20	38°56'49.8"N	8°30'40.9"W
	R07_20	14/set/20	38°57'01.0"N	8°39'52.9"W
	R08_20	14/set/20	38°56'21.7"N	8°38'53.6"W
	R09_20	14/set/20	39°02'05.4"N	8°44'44.1"W
BH Sado	A10_20	01/out/20	38°23'07.1"N	8°27'23.3"W
	A11_20	01/out/20	38°22'13.3"N	8°28'20.1"W
BH Mondego	M14_20	30/set/20	40°11'12.6"N	8°42'46.3"W

Anexo 2. Procedimento laboratoriais otimizado para condução dos ensaios de quebra de dormência de *L. fusca* subsp. *fascicularis*:

1. Colheita e armazenamento:

Colheita de panículas de plantas de interesse para sacos de papel e após limpeza e secagem em laboratório, armazenar em seco, em frascos de vidro, em câmara frigorífica a 3 °C, na obscuridade.

2. Desinfecção:

- a. Colocação de sementes em gobelé com 20 mL de etanol (Sigma) a 70% durante 20 min com agitação (íman);
- b. Passagem das sementes para um cadinho Gooch perfurado (Staatlich Berlin) e por água corrente durante 5 min a fim de retirar o excesso de etanol;
- c. Colocação das sementes num gobelé com 20 mL de hipoclorito de sódio a 4% (LabChem), adicionar 2 gotas de detergente da loiça, durante 20 min, com agitação;
- d. Enxaguamento das sementes por água corrente durante 5 min, a fim de retirar o excesso de hipoclorito de sódio.

3. Procedimento geral:

- a. Estratificação por frio húmido, colocar as sementes em copos de precipitação de 100 mL com 50 mL água destilada e fechar com parafilme, colocados em câmara a 3 °C, na obscuridade, durante 5 meses.
- b. Após esse período, colocar 50 sementes desinfetadas a germinar em placa de Petri de PVC 90 mm, com 25 mL de agar (1%) como substrato, seladas com parafilme a fim de evitar perdas por evaporação, e colocar em câmara ARALAB com alternância de temperaturas 23/18 °C, 16 h de luz.
- c. A avaliação da germinação (radícula > 2 mm) de dois em dois dias.

Anexo 3. Procedimento laboratoriais otimizado para condução dos ensaios de sensibilidade a herbicidas em *Cyperus difformis*:

1. Colheita e armazenamento:

Colher as inflorescências para sacos de papel e transportar para laboratório onde deverão ser sujeitas a limpeza e secagem. As sementes recolhidas deverão ser armazenadas em câmara frigorífica a 3 °C, na obscuridade.

2. Limpeza:

Para cada população pesar cerca de 500 sementes em cadinho de porcelana. O procedimento de limpeza das sementes, com separação das maiores impurezas, lemas e páleas é efetuada com “post-it”, por se tratarem de sementes muito leves, de reduzida dimensão.

3. Procedimento geral:

Depois de limpas, colocar em placas de Petri de PE esterilizadas 90 x 15 mm, com 25 mL de agar (1%) (Biokar Diagnostics), seladas com parafilme e colocadas em câmara ARALAB (23/18 °C, 16 h de luz) para induzir germinação e posterior transplantação (BBCH 10);

Para o ensaio, preparar soluções de: 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100 mg.L<sup>-1</sup>, por diluição de uma solução-mãe preparada a partir do produto comercial, em tubos graduados FALCON de 15 mL.

Colocar 9 mL de agar 1% e 1 mL de cada solução de modo a diluir e obter as concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> e daí transferir 1 mL de solução de agar com concentração de herbicida para cada poço da microplaca de cultura celular (6 x 4 poços). Transplantar 10 plântulas de *C. difformis* para cada poço (BBCH 10), havendo quatro repetições por cada concentração, incluindo a Testemunha.

Anexo 4. Resultados considerados inválidos dos ensaios de sensibilidade a herbicidas em *C. difformis*.

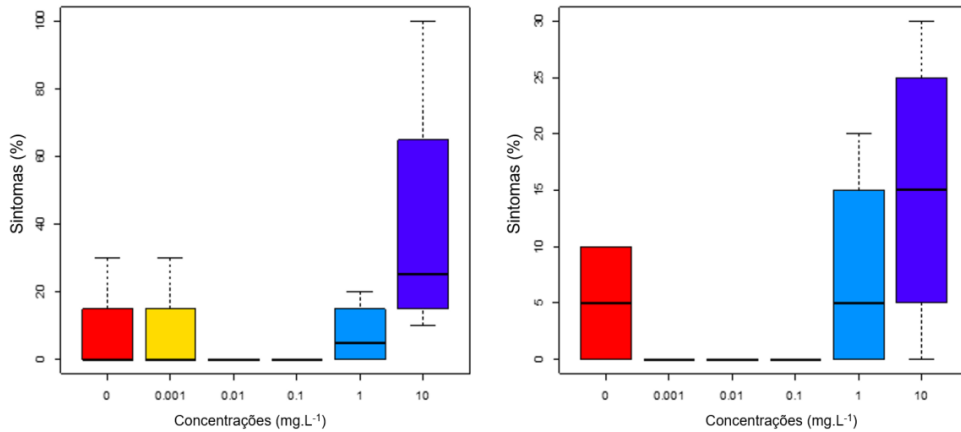


Figura1. Efeito do penoxsulame no ensaio 2 em duas populações de *Cyperus difformis* (A07\_19 - esq. e A10\_19 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100 %, plantas mortas) (n= 40/concentração).

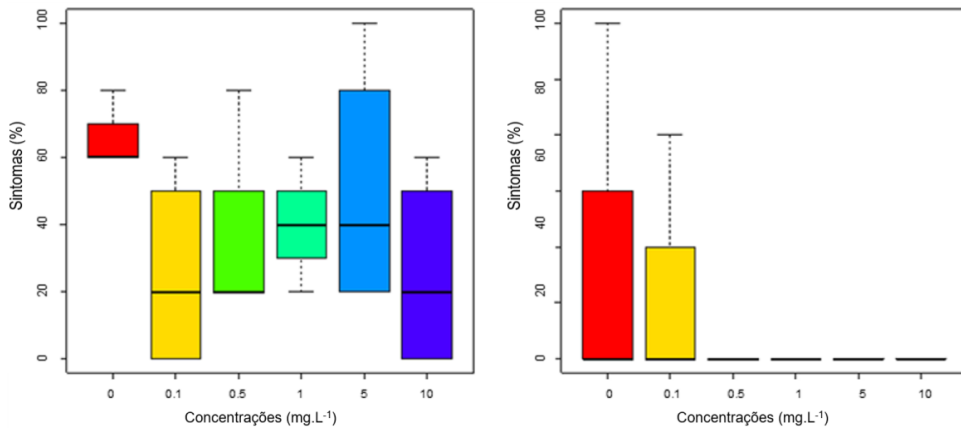


Figura 2. Efeito da bentazona no ensaio 3 em duas populações de *Cyperus difformis* (A07\_19 - esq. e A12\_20 - dir.) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100 %, plantas mortas) (n= 40/concentração).

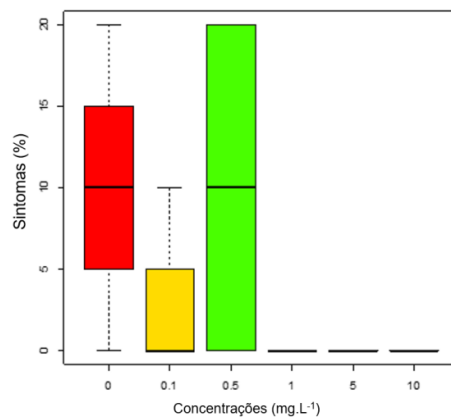


Figura 3. Efeito da bentazona no ensaio 3 numa população de *Cyperus difformis* (A07\_19) expresso numa escala de sintomas de fitotoxicidade (0%, plantas sem sintomas a 100 %, plantas mortas) (n= 40/concentração).