

RESISTÊNCIAS CRUZADAS EM BIÓTIPOS DE *ALISMA PLANTAGO-AQUATICA* RESISTENTES AO BENSULFURÃO-METILO E SUAS CONSEQUÊNCIAS

CROSS RESISTANCE IN BENSULFURON-METHYL RESISTANT *ALISMA PLANTAGO-AQUATICA* BIOTYPES

ISABEL M. CALHA¹, ILÍDIO MOREIRA², FÁTIMA ROCHA¹

RESUMO

A aplicação repetida de bensulfurão-metilo em arrozais dos vales dos rios Sorraia, Sado e Mondego seleccionaram populações resistentes (R) de *Alisma plantago-aquatica* (Mo260, Sa88, So306 e So307). Determinou-se o nível de resistência ($NR = ED_{50} R / ED_{50} S$) ao bensulfurão-metilo em plantas com 26 dias (6 filódios lineares) e com 42 dias (6 filódios expandidos) e a resistência cruzada a 14 herbicidas. Confirmou-se que quatro populações eram resistentes e uma (Mo190) era susceptível. Esta população provinha de um campo tratado com bensulfurão-metilo e bentazona anualmente. Os resultados dos ensaios de dose-resposta confirmam a maior susceptibilidade ao bensulfurão-metilo, no estado fenológico

116. Apresentaram resistência cruzada a todos os herbicidas inibidores da ALS excepto ao metsulfurão-metilo e ao imazetapir. Obtiveram-se valores de NR de 3 a 315 para azimsulfurão, cinosulfurão e etoxisulfurão. Bentazona, MCPA, oxadiazão e propanil apresentaram NR próximos da unidade, indicando que herbicidas com diferente modo de acção mantiveram a sua eficácia e podem constituir alternativa no combate a populações de *A. plantago-aquatica* resistentes ao bensulfurão-metilo.

Palavras-chave: ensaios de dose-resposta, estado fenológico, sulfonilureias.

ABSTRACT

The repetitive use of bensulfuron-methyl in rice fields from Sorraia, Sado and Mondego river valleys had selected resistant (R) populations of *Alisma plantago-aquatica* in Portugal, identified as So306, So307, Sa88, Mo190; Mo260, respectively. The response of R-biotypes to bensulfuron-methyl at 26 days after seeding (DAS) and 42 DAS and the cross-

¹ Instituto Nacional dos Recursos Biológicos
Quinta do Marquês
2780-155 Oeiras, Portugal.
isamc@dgpc.min-agricultura.pt

² Instituto Superior de Agronomia/Universidade
Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017,
Lisboa, Portugal.

resistance either to ALS- inhibitors or to herbicides with other mode of action, was investigated in dose-response experiments. The results confirmed bensulfuron-methyl resistance in four biotypes, but not in Mo190, which had been also treated with bentazon every year. Younger plants (6 linear phyllo-dium, BBCH 116) were more susceptible to bensulfuron-methyl than were older plants (6 expanded phyllo-dium, BBCH 126). R-biotypes presented cross-resistance to all ALS-inhibitors studied except for imazethapyr and metsulfuron-methyl. Resistance indexes (RI= ED_{50R}/ED_{50S}) ranged from 3 to 313 for the three sulfonylurea herbicides. Herbicides with different mode of action including bentazon, MCPA, oxadiazon and propanil showed resistance indices of one, indicating that all herbicides tested had equal activity to both R- and S-biotypes. It was concluded that these herbicides could be effective for the control of resistant *A. plantago-aquatica* biotypes in rice paddy fields.

Key words dose response bioassay, growth stage, sulfonylureas.

INTRODUÇÃO

Os herbicidas que actuam na enzima acetolactato sintase/acetohidroxiácido sintase [ALS/AHAS, EC 2.2.1.6] (NC- IUBMB, 2002) são normalmente designados por inibidores da ALS (Mallory-Smith & Retzinger, 2003). Esta enzima cataliza a primeira reacção da biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Schloss, 1990), três dos aminoácidos essenciais para o Homem. Estes aminoácidos são indispensáveis ao crescimento das plantas e a sua falta pode provocar a morte da planta (Devine & Preston, 2000). No entanto, a célula leva tempo a esgotar as suas reservas e as

plantas podem levar três a quatro semanas a morrer. Como este efeito é lento, Brown (1990) refere que o aparecimento de sintomas característicos das sulfonilureias, como a redução dos lóbulos de folhas recortadas (Cobbs, 1992), pode estar associado ao primeiro efeito da actividade destes herbicidas. Este efeito consiste na rápida inibição da divisão celular ao nível dos meristemas, que ocorre poucas horas após a aplicação do herbicida.

Conhecem-se actualmente cinco famílias químicas de herbicidas inibidores da ALS: sulfonilureias, imidazolinonas; triazolopirimidinas; pirimidinilóxibenzoicos e sulfonilcarbonil-triazolinonas (Duke & Dayan, 2001) que, provavelmente, actuam em diferentes centros activos da enzima que não coincidem totalmente (Schloss, 1990).

As sulfonilureias, desde a sua introdução no mercado em 1982, têm sido a família química de herbicidas mais utilizados no mundo (Saari *et al.*, 1994; Gressel, 2002). As características de elevada eficácia que permitem que estes herbicidas sejam aplicados em doses reduzidas ($g\ ha^{-1}$), foram as responsáveis pelo rápido aparecimento de biótipos resistentes (R) em espécies infestantes tão importantes como *Lactuca serriola* (Mallory-Smith *et al.*, 1990) e *Kochia scoparia* (Primianni *et al.*, 1990). Outros factores, como a facilidade de ocorrência de mutações naturais à ALS (elevada frequência do alelo resistente) e o facto do alelo R ter um efeito mínimo na adaptabilidade, em condições de ausência de pressão de selecção provocada pelo herbicida também contribuíram para o elevado risco de resistência associado a estes herbicidas (Tranel & Wright, 2002).

Actualmente é a família química com maior número de casos de resistência (93) e cuja evolução tem tido o crescimento mais rápido, tanto na Europa como noutros países (Heap, 2006). De facto, entre 2002 e 2005 dos

nove novos casos de resistência na Europa, seis foram de herbicidas inibidores da ALS (Moss, 2002; Moss 2005).

A resistência aos herbicidas inibidores da ALS afecta diferentes culturas, embora as mais importantes sejam os cereais, incluindo o milho e o arroz. Das 30 espécies infestantes da cultura do arroz com biótipos R, uma percentagem considerável apresenta resistência a herbicidas inibidores da ALS, principalmente da família química das sulfonilureias. O fenómeno afecta plantas das principais famílias de infestantes da cultura do arroz, como Lythraceae, Scrophulareaceae, Pontedereaceae, Poaceae, Cyperaceae e Alismataceae. Destas últimas destacam-se *Damanosium minus* R. Br. Buch na Austrália e *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlester na Austrália e Califórnia (Pappas-Fader *et al.*, 1993; Graham *et al.*, 1996) e *Alisma plantago-aquatica* em Portugal, Espanha e Itália (Calha *et al.*, 1995; DePrado *et al.*, 1997; Sattin *et al.*, 1999).

A importância da *Alisma plantago-aquatica* (orelha-de-mula, colhereiro, colhereiro, colheres, tanchagem-de-água) (Coutinho, 1974; Rocha, 1996) apesar de não ser uma espécie muito competitiva, tem vindo a aumentar desde que foram identificadas populações resistentes (R) ao bensulfurão-metilo (Calha *et al.*, 1995; 1999). O primeiro caso de resistência ocorreu num arrozal com uma história de 6 anos de aplicação de bensulfurão-metilo (Calha *et al.*, 1995). Desde o primeiro caso de resistência foram detectados campos com populações resistentes nas principais zonas produtoras de arroz (Calha *et al.*, 1999), que abrangeram as bacias hidrográficas dos rios Mondego, Tejo e Sorraia, Sado e Mira. A elevada susceptibilidade da *A. plantago-aquatica* ao bensulfurão-metilo pode ter sido um dos factores responsáveis pela ocorrência de resistência nesta espécie.

Na maior parte dos casos, a resistência aos

herbicidas inibidores da ALS tem sido atribuída à insensibilidade desta enzima, como resultado de uma mutação pontual – num único nucleótido – do gene da enzima (Saari *et al.*, 1994; Hinz & Owen, 1997; Tranel & Wright, 2002). Conhecem-se actualmente cinco mutações pontuais no gene da ALS das plantas superiores que conferem diferentes níveis de resistência às sulfonilureias e a outros inibidores da ALS (Gressel, 2002; Tranel & Wright, 2002). Para além da alteração do local de acção há referências, embora menos frequentes, a outros mecanismos que podem causar resistência, como a taxa de metabolismo mais acelerada do herbicida, que afecta principalmente infestantes gramíneas e a sobre-expressão do gene da ALS. Este último foi identificado numa linha isogénica (*R corn inbred line*) de milho (*Zea mays* L.) e em *Sisymbrium orientale* Thorn (Forlani *et al.*, 1991; Boutsalis *et al.*, 1999).

O conhecimento do mecanismo de resistência e dos padrões de resistência cruzada pode contribuir para o planeamento mais adequado das estratégias de combate aos biótipos R (Cotterman & Saari, 1992; Shaner, 1995). Todavia, para os biótipos R a herbicidas inibidores da ALS, os níveis de resistência e os padrões de resistência cruzada a herbicidas com o mesmo modo de acção são muito variáveis e difíceis de prever, o que enfatiza a complexidade das estratégias para combater a resistência a estes herbicidas (Wrubel & Gressel, 1994; Sibony & Rubin, 2003).

Para conhecer o mecanismo responsável pela resistência ao bensulfurão-metilo, nas populações R identificadas nas diferentes regiões orizícolas de Portugal (Calha *et al.*, 1999), é necessário conhecer o nível de resistência ao herbicida responsável pela selecção e o padrão de resistência cruzada a outros herbicidas selectivos para a cultura do arroz. Para esta cultura em 1996, estavam autorizadas em Portugal (DGPC, 1997) dez

substâncias activas (s.a.) das quais cinco controlavam eficazmente a espécie *A. plantago-aquatica*, designadamente, bensulfurão-metilo, bentazona, cinosulfurão, MCPA e 2,4D+MCPA. Actualmente foram retirados do mercado nacional o 2,4-D, o cinosulfurão e as misturas contendo mefenaceto. Os herbicidas mais recentes são indicados para o controlo de infestantes gramíneas como *Echinochloa* spp., *Glyceria declinata* e *Leersia oryzoides* não havendo novos modos de acção para o controlo de *Alisma plantago-aquatica* e outras infestantes designadas de “folha larga” (DGPC, 2006). Em Itália, onde a área de arroz é significativamente superior à nacional com 200 000 ha dedicados àquela cultura, contra 26 000 ha em Portugal (FAO, 2003), os orizicultores têm maior escolha de herbicidas para fazer face a uma flora infestante também mais diversificada (Vigianni *et al.*, 2003). Todavia, considerando o seu modo de acção verifica-se que os eficazes sobre *A. plantago-aquatica* são na sua maioria inibidores da ALS pertencentes às famílias químicas sulfonilureias (azimsulfurão, bensulfurão-metilo, etoxisulfurão e imazosulfurão) triazolopirimidinas (metosulame e penoxsulame) e dos pirimidiniloxibenzóicos (bispiribace-sódio). No que respeita a herbicidas com diferente modo de acção, para além das s.a. que também estão autorizadas em Portugal, podem ser aplicados os herbicidas vulgarmente designados por “hormonais” (HRAC – O), como a dicamba e o 2,4-DB; os inibidores da divisão celular (HRAC – K3) como o pretilacloro e inibidores da biossíntese dos carotenóides (HRAC – F3) como a clomazona (Fitogest, 2006).

Neste trabalho estudaram-se populações de *Alisma plantago-aquatica* resistentes ao bensulfurão-metilo de regiões geográficas diferentes. O estudo teve como principais objectivos: 1) confirmar e quantificar a magnitude da resistência ao bensulfurão-metilo, em dois estados fenológicos; 2) avaliar a resis-

tência cruzada a outros herbicidas inibidores da ALS e herbicidas com modo de acção diferente que possam constituir alternativa ao bensulfurão-metilo no controlo de biótipos R, no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Herbicidas

Para a selecção dos herbicidas a incluir nos estudos de resistência cruzada, seguiu-se o critério definido por Rubin (1991) ou seja herbicidas que além de terem um modo de acção distinto (HRAC, 1998) sejam metabolizados por sistemas enzimáticos diferentes (Usui, 2001). Foram estudados 14 herbicidas (Quadro 1), dos quais sete são inibidores da ALS, incluindo: cinco sulfonilureias azimsulfurão, bensulfurão-metilo, cinosulfurão, etoxisulfurão, metsulfurão-metilo; duas imidazolinonas, imazetapir e imazapir; sete herbicidas com modo de acção diferente, bentazona, MCPA, propanil, triclopir, pretilacloro+fencloirim, oxadiargil e oxadiação.

Material vegetal

Estudaram-se populações de *Alisma plantago-aquatica* resistentes (R) ao bensulfurão-metilo, oriundas das principais regiões orizícolas do País. Estas populações foram obtidas a partir do conjunto de 53 populações resistentes (R) e 50 populações susceptíveis (S) ao bensulfurão-metilo, confirmadas previamente em ensaios de estufa com dose única (Calha *et al.*, 1999). Por região seleccionaram-se duas a quatro populações R ao bensulfurão-metilo cuja percentagem de mortalidade nos ensaios tivesse sido de 90-100%, e provenientes de arrozais sujeitos à aplicação consecutiva, durante 5-6 anos seguidos, de herbicidas contendo sulfonilureias.

Quadro 1 – Herbicidas estudados, identificados pela substância activa, produto comercial e com indicação da dose, modo de acção e mecanismo de degradação.

Substância activa	Produto comercial	Dose N ^a (g ha ⁻¹)	Modo de acção (Código HRAC)	Degradação da s.a. (sistema enzimático)
azimsulfurão	Gulliver (WG, 50 g s.a. kg ⁻¹ , Dupont)	50	B	Cit-P450
bensulfurão-metilo	Londax 60DF (WG, 60g s.a.kg ⁻¹ , Dupont)	51- 60	B	Cit-P450
cinosulfurão	Setoff (WG, 80 g s.a. kg ⁻¹ , Bayer)	80	B	Cit-P450
etoxisulfurão	Sunrice WG60(WG, 60g s.a.kg ⁻¹ , Dupont)	30- 60	B	Cit-P450
metsulfurão-metilo	Ally (WG, 20 g s.a. kg ⁻¹ , Dupont)	2	B	Cit-P450
imazetapir	Pursuit (SL, 240 g s.a. L ⁻¹ , Cyanamid)	60	B	Cit-P450
imazapir	Arsenal (SL, 250 g s.a. L ⁻¹ , Cyaniberica)	500	B	Cit-P450
bentazona	Basagran (SL, 480 g s.a. L ⁻¹ , BASF)	1440- 1920	C3	GST
MCPA (éster isocitílico)	Printhormona (EC, 420 g s.a. L ⁻¹ , Bayer)	800- 1200	N	-
oxadiargil	Topstar (EC, 400 g s.a. L ⁻¹ , RPAgro)	75- 100	O	-
oxadiazão	Ronstar (EC, 250 g s.a. L ⁻¹ , RPAgro)	400- 750	O	-
pretilacloro+fenclorin	Sofit 240 (EC, 240 g s.a. L ⁻¹ , Novartis)	1200	K3	GST
propanil	Propariz (EC, 360 g s.a. L ⁻¹ , Bayer)	3600- 9000	C2	AAA
triclopir	Garlon (EC, 480 g s.a. L ⁻¹ Dow)	300- 400	N	GST

^a – destacaram-se a negrito as doses utilizadas nos ensaios de dose-resposta;

cit-P450, citocromo P450-monooxigenases; GST, glutationa-S-transferases; AAA, aril-acilamidase.

As amostras de sementes das populações foram identificadas com um sistema de codificação, constituído por duas letras e três algarismos. As duas primeiras letras correspondem ao nome da bacia hidrográfica origem das sementes (Mo-Mondego; Sa-Sado e So-Sorraia) e os três algarismos à numeração do questionário de inquérito incluído na prospecção de resistência realizada ao abrigo do projecto PAMAF 1017 – *Resistência adquirida a herbicidas por infestantes da cultura do arroz* - (Rocha, 1999).

No Quadro 2 apresenta-se a localização e o resumo dos herbicidas aplicados em cada arrozal, origem das populações de *Alisma plantago-aquatica* R ao bensulfurão-metilo. As populações susceptíveis, utilizadas como referência, eram oriundas da bacia hidrográfica do rio Mondego (Mo 220 e Mo222).

Ensaio com planta inteira

Em Setembro de 2000, imediatamente antes da colheita da cultura do arroz, colheram-se as inflorescências de cerca de 40 plantas de *Alisma plantago-aquatica*, aleatoria-

mente por todo o campo, de forma a obter mais de 1000 sementes por arrozal. As sementes, depois de limpas e secas em estufa, foram submetidas a pré-tratamento de quebra de dormência: manutenção das sementes a 1-2°C na obscuridade, em solução de KNO₃ (0,2%) durante um período de 18 dias (Munscher, 1936) em câmara incubadora CASSEL (CBT). Para incentivar a germinação, as sementes permaneceram na mesma solução e foram transferidas para condições de alternância de temperatura e luz de 15/30 °C com 16 h de luz, associada à temperatura mais elevada, durante 5-6 dias, até ao aparecimento do cotilédone.

Quando atingiram o estado fenológico de 1-2 filódios lineares (BBCH 111-112) foram transplantadas para vasos de PVC de 6 cm de diâmetro contendo substrato saturado de mistura solo:turfa (2:1) (solo de textura franco-arenoso pH: 7,5; K₂O: 188; P₂O₅: 100; M.O. 4,2 % e turfa “*substrato Brill Tipo 3 especial 1500 PGMix*”). Colocaram-se 12 vasos por tabuleiro de PVC (20x26x5cm) onde se mantiveram à capacidade de campo por sub-irrigação com uma solução de sulfato de cobre (10-12 g L⁻¹ CuSO₄) para evitar o desenvol-

Quadro 2 - Herbicidas^a aplicados durante sete anos (1991-1997) nos canteiros em monocultura de arroz, onde foram colhidas as amostras de *Alisma plantago-aquatica* R ao bensulfurão-metilo.

Ano	Origem Cultura	BH do rio Mondego Mo260	BH do rio Mondego Mo190	BH do rio Sado Sa088	BH do rio Sorraia So306	BH do rio Sorraia So307
1991	Arroz	BSM+ mefenaceto + molinato		BSM+ mefenaceto + molinato		BSM+ molinato
1992	Arroz	BSM+ mefenaceto + molinato	BSM+ molinato propanil	quincloracque bentazona BSM+ mefenaceto + molinato	molinato BSM+ molinato	
1993	Arroz	molinato	BSM+ mefenaceto + molinato propanil	quincloracque bentazona BSM+ mefenaceto + molinato	molinato BSM+ molinato	
1994	Arroz	molinato	BSM+ mefenaceto + molinato propanil	quincloracque bentazona BSM+ molinato		BSM+ molinato
1995	Arroz	molinato	BSM+ mefenaceto + molinato propanil	quincloracque bentazona BSM+ mefenaceto + molinato		BSM+ molinato
1996	Arroz	molinato	BSM+ mefenaceto + molinato propanil	molinato BSM+ mefenaceto + molinato	propanil MCPA	BSM+ molinato
1997	Arroz	molinato	BSM+ mefenaceto + molinato propanil	molinato		

^a- BH – bacia hidrográfica; BSM (bensulfurão-metilo).

vimento de algas (Graham *et al.*, 1996).

Durante um período de adaptação de quinze dias (do meio líquido onde germinaram e desenvolveram os primeiros filódios, para meio sólido) mantiveram-se os tabuleiros envolvidos com filme de PVC até atingirem o estado fenológico adequado à aplicação, seis filódios lineares (116) ou expandidos (126). Desta forma, a humidade relativa e a temperatura mantinham-se elevadas no ambiente que rodeava as plântulas e provocava uma “forçagem” do seu desenvolvimento. Em ensaios prévios realizados em câmaras de crescimento com condições controladas, registou-se um incremento na taxa de crescimento das plântulas protegidas com PVC relativamente às não protegidas.

Os ensaios foram realizados em estufa não climatizada. Verificou-se que as temperaturas mínimas nunca estiveram abaixo dos 17 °C e as máximas atingiram os 40 °C nos meses de Julho e Agosto. Para manter uma temperatura mínima de 17 °C o compartimento foi aquecido durante 24 h nos meses de Outono e Inverno e o suplemento de 4 horas de luz (19.00-23.00h) com 230 mmol m⁻² s⁻¹ foi fornecido por quatro lâmpadas de vapor de mercúrio, de 400 Watts, com reflector (PHILLIPS HLR-G).

Os herbicidas foram aplicados após a emergência das infestantes com um pulverizador de jacto projectado a ar comprimido OPS (“Oxford Precision System”), equipado com um bico de leque (000) e calibrado para aplicar 245,3 L ha⁻¹ de solução, à pressão de 275 kPa com um volume de calda de 50 ml que permitia uma única passagem sobre as plantas. Cada herbicida foi aplicado de 0,06 a 32 vezes a dose recomendada; esta gama de doses dependia da sensibilidade das populações aos herbicidas. Não se procedeu a qualquer aplicação sobre as plantas da modalidade testemunha. Após a aplicação colocou-se cada vaso num contentor individual. As plantas foram regadas periodicamente com água por

sub-irrigação, mantendo o solo sempre saturado à capacidade de campo, mas sem lâmina de água para evitar o desenvolvimento de algas. Vinte e um dias após a aplicação (DAA) cortaram-se as plantas à superfície do solo para determinação do peso verde. Excepção feita no ensaio com bentazona que, por ser um herbicida que actua por contacto e de rápida acção, a determinação do peso verde foi realizada sete DAA.

Caracterização de populações R ao bensulfurão-metilo

Determinação do NR ao bensulfurão-metilo e do grau de influência do estado fenológico na magnitude da resistência

Estudou-se a resposta das plantas de *Alisma plantago-aquatica* a doses crescentes de bensulfurão-metilo em dois estados fenológicos distintos: plantas com 24-43 dias após o transplante (DAT), com seis filódios expandidos - BBCH 126 - plantas com 14-21 DAT, com seis filódios lineares (Meier, 1997).

Realizaram-se duas séries de ensaio com sete populações de *A. plantago-aquatica*, provenientes de arrozais situados nas bacias hidrográficas dos rios Mondego (Mo190, Mo220 Mo222 e Mo260), Sado (Sa88) e Sorraia (So306 e So307). A primeira decorreu de Janeiro a Maio de 2001 com plantas no estado fenológico BBCH 126. A segunda série de ensaios decorreu com plantas no BBCH 116, durante os meses de Verão (Maio – Julho) de 2001 e Primavera (Março-Maio) de 2002. Em cada ensaio aplicou-se uma gama de 12 doses de bensulfurão-metilo. As doses e populações ensaiadas indicam-se no Quadro 3. Nos ensaios realizados com plantas no BBCH 116 as doses foram reduzidas relativamente ao ensaio com plantas no BBCH 126, pois plantas mais pequenas apresentavam maior susceptibilidade ao herbicida.

Quadro 3 - Ensaios realizados para determinação do nível de resistência ao bensulfurão-metilo e do padrão de resistências cruzadas a outros herbicidas, com indicação da população e dose estudada.

Objectivo	Estado fenológico	População	Herbicida e dose aplicada (g s.a. ha ⁻¹)
Resistências cruzadas	BBCH 126	Mo260, Sa88; So307, So306	bensulfurão-metilo (15, 30, 60, 120,240,480)
		Mo190, Mo220, Mo222	bensulfurão-metilo (7,5, 15, 30, 60, 120,240,480)
	BBCH 116	Mo260, Sa88; So307, So306	bensulfurão-metilo (3,75; 7,5; 15, 30, 60, 120,240,480)
		Mo190, Mo220, Mo222	bensulfurão-metilo (0,475; 1,875; 3,75; 7,5; 15, 30, 60, 120,240)
	BBCH 116	Mo260, Sa88; So307, So306	azimsulfurão (0,16; 0,32; 0,64; 1,28;2,56; 5,12;10,24; 20,48; 49,96; 81,92; 163,84)
			cinossulfurão (2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320;640)
			etoxissulfurão (0,47; 0,94; 1,88; 3,76; 7,52; 15,04; 30,08; 60,16; 120,32)
			metsulfurão-metilo (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8)
			imazetapir (0,47; 0,94; 1,88; 3,76; 7,52; 15,04; 30,08; 60,16; 120,32)
			MCPA (4,92; 9,84; 19,68; 39,36; 78,72; 157,5; 315; 630; 1260)
Mo190, Mo222		bentazona (90; 180; 360; 720; 1440; 2880; 5760; 11520)	
		propanil (28,13; 56,3; 112,5; 225; 450; 900; 1800; 3600; 7200)	
		azimsulfurão (0,16; 0,32; 0,64; 1,28;2,56; 5,12;10,24; 20,48; 49,96; 81,92; 163,84)	
		cinossulfurão (2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320;640)	
		etoxissulfurão (0,47; 0,94; 1,88; 3,76; 7,52; 15,04; 30,08; 60,16; 120,32)	
		metsulfurão-metilo (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8)	
		imazetapir (0,47; 0,94; 1,88; 3,76; 7,52; 15,04; 30,08; 60,16; 120,32)	
		MCPA (4,92; 9,84; 19,68; 39,36; 78,72; 157,5; 315; 630; 1260)	
		bentazona (90; 180; 360; 720; 1440; 2880; 5760; 11520)	
		propanil (28,13; 56,3; 112,5; 225; 450; 900; 1800; 3600; 7200)	

Avaliação da resistência cruzada a herbicidas inibidores da ALS e herbicidas com modo de acção diferente

Para os estudos de resistência cruzada, as populações Mo222, Mo260, Sa88 e So307 de *A. plantago-aquatica* foram submetidas à aplicação dos herbicidas seguintes numa gama de nove doses cada: cinco inibidores da ALS, azimsulfurão, cinossulfurão, etoxissulfurão, metsulfurão-metilo (sulfonilureias) e imaze-

tapir (imidazolinona); dois inibidores da fotossíntese, bentazona (benzotiadiazinona) e propanil (anilida); e um análogo das auxinas, MCPA (ácido ariloxialcanóico). Os herbicidas foram aplicados no estado fenológico BBCH 116.

Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram analisados estatisticamente segundo o procedimento

recomendado por Streibig *et al.* (1993) e por Seefeldt *et al.* (1995): análise dos ensaios individuais; análise em série; comparação das curvas de dose-resposta obtidas nos ensaios combinados para as populações R e S a determinado herbicida.

Análise dos ensaios individuais

Procedeu-se à análise de variância (ANOVA) a um factor (modalidades), considerando o delineamento experimental totalmente casualizado, o que permite determinar se houve diferenças significativas entre doses e a necessidade de transformação da variável. Seguidamente ajustou-se um modelo de regressão não linear, do tipo logístico, pois em ensaios biológicos a curva de dose-resposta típica segue a forma sigmóide (Streibig, 1992). Neste trabalho foi seguido o modelo logístico proposto por Streibig *et al.* (1993) e Kudsk *et al.* (1995) com a expressão:

$$y=f(x)=c+\frac{d-c}{(1+(x/ED_{50}))^b} \quad \text{(expressão 1)}$$

ou, equivalente

$$y=c+\frac{d-c}{(1+\exp[b(\log(x)-\log(ED_{50}))])}$$

Em que y , corresponde ao peso verde das plantas de *Alisma plantago-aquatica* (g) e x , à dose de herbicida (g ha⁻¹). Uma das vantagens da curva descrita pela expressão (1) é que os parâmetros utilizados no modelo têm um significado biológico. Assim, d , corresponde à assíntota superior da curva de dose-resposta, i.e., ao peso verde (g) obtido na dose mais reduzida de herbicida; c , à assíntota inferior da curva de dose-resposta, i.e., ao peso verde (g) obtido na dose mais elevada de herbicida; b , ao declive da curva de dose-resposta obtido ao nível do valor de ED_{50} ; O ajustamento do modelo aos dados foi verificado com o auxílio do teste F. Se o teste F não for significativo

ao nível de $P=0,1$, aceita-se a hipótese nula, do ajustamento dos dados ao modelo não linear ser significativamente melhor do que ao modelo linear, e pode-se concluir que a expressão (1) descreve de uma forma adequada a variação sistemática dos dados (Seefeldt *et al.*, 1995).

Análise em série

Para a análise em série os resultados de cada ensaio foram combinados após confirmação da uniformidade das variâncias (Steel & Torrie, 1980), com uma estatística F , utilizando os valores da soma do quadrado dos resíduos determinados na ANOVA associada à regressão não linear, de acordo com a expressão (2):

$$F=\frac{(A-B-C)/k}{(B+C)/(n1+n2-2k)} \quad \text{(expressão 2)}$$

Em que A , corresponde à soma do quadrado (SS) dos resíduos dos ensaios combinados (ensaio1 + ensaio 2); B , à SS dos resíduos do ensaio1; C , à SS dos resíduos de ensaio2; $n1$, ao número de observações do ensaio 1; $n2$, ao número de observações do ensaio 2; k , ao número de parâmetros da equação. Este teste permite concluir que, se os ensaios individuais e a combinação dos ensaios tiverem a mesma variância então provêm da mesma população (Chow, 1960) e podem ser combinados num único modelo de regressão não linear. Caso contrário, as regressões são apresentadas separadamente.

Comparação das curvas de dose-resposta e determinação dos valores de ED_{50}

O índice, nível de resistência (NR), permite avaliar a magnitude da resistência. É calculado pela razão entre as doses que provocam o mesmo efeito na população R e na população S de referência – doses equipotentes (Streibig,

1992). Normalmente o parâmetro utilizado é o ED_{50} (dose que provoca a redução de 50% no peso verde) mas também podem ser usados outros como o ED_{90} (dose que provoca a redução de 90% no peso verde) (Gressel, 2002). Para a determinação do nível de resistência, não é suficiente comparar o parâmetro correspondente ao ED_{50} mas é necessário fazer a análise de toda a curva de dose resposta (Streibig *et al.*, 1993; Seefeldt *et al.*, 1995). O teste F foi utilizado para avaliar se as curvas de dose-resposta eram diferentes e para determinar se a resposta ao herbicida variava entre populações. Testou-se a hipótese nula dos quatro parâmetros dos 2 modelos não diferirem entre populações contra a hipótese alternativa de pelo menos uma das igualdades entre parâmetros ser falsa (Huet *et al.*, 2003).

A determinação do nível de resistência (NR) aos herbicidas foi feita a partir dos valores de ED_{50} e de ED_{90} obtidos na regressão não linear. Nos ensaios definitivos, utilizou-se a expressão convencional $NR = ED_{50} \text{ população R} / ED_{50} \text{ população S}$.

A análise estatística dos resultados, incluindo o ajustamento ao modelo logístico foi realizado com o “package” drc (“dose – response curve”) (Ritz *et al.*, 2004; Ritz & Streibig, 2005) do “software” R (Crowley, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização de populações de *A. plantago-aquatica* resistente ao bensulfurão-metilo

Determinação do NR ao bensulfurão-metilo e do grau de influência do estado fenológico na magnitude da resistência

Na Figura 1 apresentam-se as curvas de dose-resposta ao bensulfurão-metilo de cinco populações de *Alisma plantago-aquatica*. A

análise de curvas de dose-resposta foi realizada com base nos valores dos parâmetros estimados pelo modelo logístico (Quadro 4). Considerando a resposta de cada população ao bensulfurão-metilo, verifica-se que a estimativa dos parâmetros ED_{50} e ED_{90} foi significativamente diferente nos dois estados fenológicos (BBCH 126 e BBCH 116).

Na população Mo220, susceptível (S) de referência, a dose mais elevada de bensulfurão-metilo (240 g ha⁻¹) provocou redução do peso entre 83% e 100%, relativamente à testemunha, consoante as plantas se encontravam em BBCH 126 ou 116, respectivamente. O declive da curva de dose-resposta foi mais acentuado do que o apresentado para as populações R, em ambos os estados fenológicos. Nesta população o valor de ED_{50} = 0,08 g ha⁻¹ (BBCH 126) e 0,02 g ha⁻¹ (BBCH 116) foi significativamente inferior ao da dose recomendada, o que confirma tratar-se de uma espécie muito susceptível ao bensulfurão-metilo (Saari *et al.*, 1994; Sattin *et al.*, 1999; Heap, 2005).

A população Mo222, também S, apresentou curvas de dose-resposta ao bensulfurão-metilo idênticas às da população Mo220 com valores de ED_{50} = 0,07 g ha⁻¹ (BBCH 126) e 0,18 g ha⁻¹ (BBCH 116). Também o valor de ED_{50} = 0,08 g ha⁻¹ (BBCH 126) para a população Mo190 foi idêntico ao das outras populações susceptíveis.

Enquanto que para as populações Sa88, So306 e So307 os valores de ED_{50} foram de 256,8; 130,6; e 2181 g ha⁻¹ (BBCH 126) e de 48,6; 191,4 e 12,3 g ha⁻¹ (BBCH 116) respectivamente, correspondentes a doses superiores à recomendada de bensulfurão-metilo (60 g ha⁻¹), a população Mo260 apresentou valores de ED_{50} de (30,7 e 3,1 g ha⁻¹) significativamente inferiores ao das outras populações R. A magnitude da resistência ao bensulfurão-metilo variou entre populações e com o estado fenológico no momento da aplicação, como

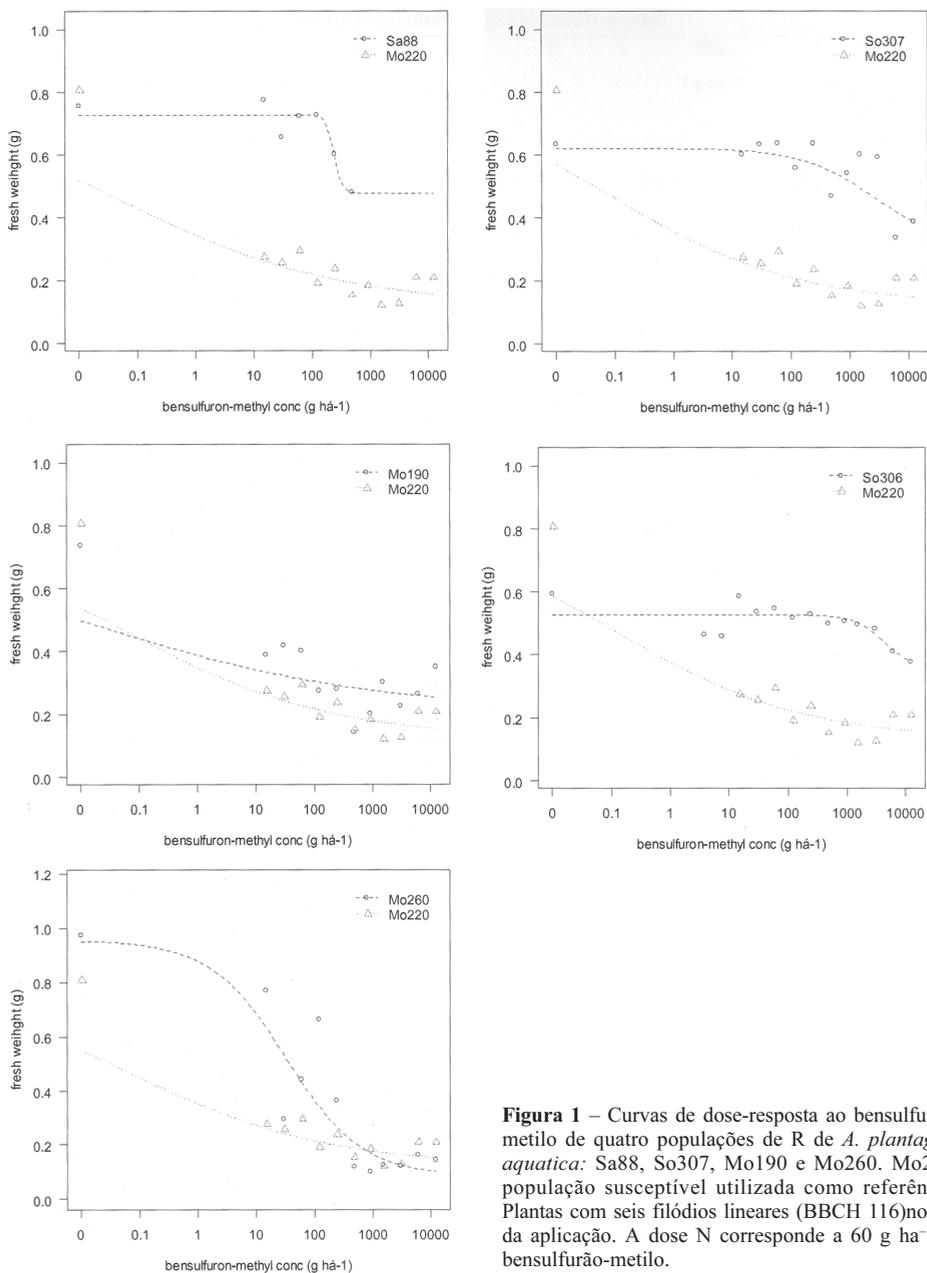


Figura 1 – Curvas de dose-resposta ao bensulfurão-metilo de quatro populações de R de *A. plantago-aquatica*: Sa88, So307, Mo190 e Mo260. Mo220, população susceptível utilizada como referência. Plantas com seis filódios lineares (BBCH 116) no dia da aplicação. A dose N corresponde a 60 g ha⁻¹ de bensulfurão-metilo.

Quadro 4 – Parâmetros da regressão não linear (SE entre parêntesis) estimados pelo modelo logístico, para a resposta do peso verde (g) de quatro populações de *A. plantago-aquatica* a doses crescentes de bensulfurão-metilo.

População	b	c	d	ED ₅₀	ED ₉₀	ANOVA	NR	Classificação
Estado fenológico ^a	(g)	(g)	(g ha ⁻¹)	(g ha ⁻¹)	(g ha ⁻¹)	(p)	$\frac{ED_{50}(R)}{ED_{50}(S)}$	
BBCH 126								
Mo260	0,70 (0,212)	0,09 (0,038)	0,95 (0,154)	30,7 (21,132)	699,9 (572,57)	1,71E-05	392	R
So307	0,70 (0,377)	0,31 (0,1007)	0,62 (0,0407)	2181,1 (2354,6)	50252,0 (101512,93)	0,0308	27893	R
Sa88	3,48 (5,42)	0,45 (0,165)	0,73 (0,0252)	256,8 (137,08)	483,3 (710,28)	0,33	8091	R
So306	9,16 (29,162)	-0,12 (18,213)	0,85 (0,036)	130,6 (407,13)	166,1 (589,40)	0,0433	1671	R
Mo222	0,32 (0,093)	0,07 (0,020)	0,90 (0,137)	0,07 (0,099)	78,05 (94,245)	0,0523	-	S
Mo220	0,26 (0,163)	0,14 (0,060)	0,81 (0,041)	0,08 (0,184)	359,5 (1302,7)	0,2826	-	S
Mo190	0,29 (0,124)	0,23 (0,031)	0,79 (0,124)	0,08 (0,131)	148,4 (348,62)	1,66E-08	1	S
BBCH 116								
Mo260	0,37 (0,212)	-0,04 (0,080)	0,47 (0,105)	3,1 (3,66)	1109,9 (3761,26)	0,0007	17	R
So307	0,98 (0,097)	0,01 (0,0013)	0,48 (0,058)	12,3 (3,81)	116,7 (21,40)	0,0007	68	R
Sa88	1,39 (0,656)	0,09 (0,047)	0,27 (0,016)	48,6 (31,70)	235,8 (303,58)	0,1043	270	R
So306	5,99 (2,012)	0,17 (0,015)	0,28 (0,006)	191,4 (22,32)	276,4 (50,19)	0,0147	1063	R
Mo222	0,74 (0,149)	0,02 (0,0046)	0,40 (0,042)	0,18 (0,080)	3,4 (1,15)	1,61E-02	-	S
Mo220	0,43 (0,881)	-0,0008 (0,08148)	0,54 (0,032)	0,02 (0,116)	2,6 (10,27)	0,8645	-	S

^a BBCH 126 – plantas com seis filódios expandidos (30-45 DAT); BBCH 116 - plantas com seis filódios lineares (15-25 DAT).

comprovam os resultados apresentados que correspondem a reduções de 80 a 99% nos valores do ED_{50} , quando se passa de plantas com seis filódios expandidos para plantas com seis filódios lineares. No entanto os valores de $NR [ED_{50}(R)/ED_{50}(S)]$ atingidos de 27893, 8091, 1671 e 392 (BBCH 126) e de 68, 270, 1063 e 17 (BBCH 116), respectivamente para So307, Sa88, So306 e Mo260, permitem confirmar que as quatro populações são resistentes ao bensulfurão-metilo.

Todavia a população So306, com a mesma origem da população So307 (arrozais da bacia

hidrográfica do rio Sorraia) não manifestou alteração na susceptibilidade ao bensulfurão-metilo com o estado fenológico, o que pode estar associado à maior pressão de seleção a que a população So306 esteve sujeita, mantida durante 6 anos em regime de monocultura-monoherbicida, comparada com a população So307 proveniente de um arrozal onde houve um ano de interrupção de cultura e consequentemente da aplicação de herbicidas (Quadro 4).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos para biótipos R ao bensulfurão-

metilo pertencentes a outras espécies infestantes do arroz. Estudos com biótipos R às sulfonilureias da Coreia, com as espécies *Monochoria korsakowii*, *Monochoria vaginalis* (Pontedereaceae) e *Limnophila sessiliflora* (Scrophulariaceae) também referem que o *NR* varia com o herbicida em estudo e com o estado de desenvolvimento das plantas na altura da aplicação (Park *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2001). A partir dos 21 dias após a sementeira (DAS) a sensibilidade ao pirizal-sulfurão diminuiu para metade dos valores do *NR* registados para plantas mais jovens (com 2, 7 e 14 DAS). A redução da sensibilidade foi ainda mais evidente para o bensulfurão-metilo. Para este herbicida verificou-se uma redução gradual na sensibilidade com o aumento do desenvolvimento das plantas. O *NR* passou de 17 para 42, em plantas com 14 e 21 DAS, enquanto que o *NR* era de 6 e 9 para plantas com 2 e 7 DAS, respectivamente (Hwang *et al.*, 2001).

Além do estado fenológico também a origem das populações influencia a magnitude da resistência. A população So306 apresentou valores do *NR* idênticos aos obtidos para um biótipo italiano de *A. plantago-aquatica* (Sattin *et al.*, 1999) com *NR*= 1699. Por outro lado, Matias (2005) determinou a resistência de novas populações de *Alisma plantago-aquatica* portuguesas de diferentes origens geográficas, e concluiu que as mais resistentes tinham origem em arrozais da bacia hidrográfica do Tejo e Sorraia, com *NR* de 2102 e 457, seguida de populações da bacia hidrográfica do Mondego, com *NR* de 124. Menos resistentes foram as populações provenientes de Soure e da bacia hidrográfica do rio Sado, com *NR* de 11 e 13, respectivamente. Nos estudos realizados com biótipos R ao bensulfurão-metilo de outras espécies infestantes de arrozais, como *Cyperus difformis*, também se obtiveram diferentes *NR* associados à origem geográfica de cada biótipo. Assim, Busi *et al.* (2004)

quantificaram *NR* de 1372, 126 e 239 para biótipos provenientes da Califórnia, Itália e Espanha respectivamente, enquanto Osuna *et al.* (2002) obtinham *NR*>26 para outro biótipo californiano. Noutras espécies como *Monochoria korsakowii*, *Schoenoplectus mucronatus* e *Lindernia micrantha*, os *NR* variaram eram 100-126, 231 e 282 respectivamente (Wang *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1999; Sattin *et al.*, 1999).

Avaliação da resistência cruzada a herbicidas alternativos ao bensulfurão-metilo *Herbicidas inibidores da ALS*

No Quadro 5 apresentam-se as estimativas, pelo modelo logístico, dos valores dos parâmetros da curva de dose-resposta. Verifica-se que as três populações estudadas apresentaram resistência cruzada ao azimsulfurão embora apresentem níveis de resistência diferentes. A população So307 é a mais resistente (*NR*=213), seguida da Mo260 (*NR*=33) e a população Sa88 foi a menos resistente (*NR*= 3).

No que respeita ao cinosulfurão e ao etoxisulfurão, herbicidas que provocaram respostas semelhantes, os valores de *NR* foram inferiores aos determinados para o azimsulfurão. A população So307 manteve-se como a mais resistente a ambos os herbicidas, com *NR* de 20 e 55 para o cinosulfurão e etoxisulfurão, respectivamente. A população Sa88 foi ligeiramente mais resistente ao cinosulfurão (*NR*=7) e menos resistente ao etoxisulfurão (*NR*=11) do que a população Mo260, que registou valores de *NR* de 6 e de 16, respectivamente.

A reacção das plantas das três populações a doses crescentes de metsulfurão-metilo foi significativamente diferente das outras sulfonilureias, apresentando *NR* perto da unidade, o que reflecte a elevada sensibilidade das plantas a este herbicida. Conclui-se que não houve resistência cruzada entre o metsulfurão-

Quadro 5 - Parâmetros da regressão não linear estimados (SE entre parêntesis^a) pelo modelo logístico^b, para a resposta do peso verde (g) de quatro populações de *A. plantago-aquatica* a doses crescentes de herbicidas alternativos ao bensulfurão-metilo

Herbicida População	b	c (g)	d (g)	ED₅₀ (g ha⁻¹)	NR <u>ED₅₀ (r)</u> ED₅₀ (S)
azimsulfurão					
Mo222	0,66 (1,421)	0,008 (0,0140)	0,20 (0,016)	0,03 (0,183)	-
Mo260	1,33 (0,534)	0,005 (0,0140)	0,78 (0,029)	0,98 (0,432)	33
Sa88	1,61 (3,555)	0,01 (0,012)	0,68 (0,026)	0,1 (0,41)	3
So307	7,33 (3,374)	0,02 (0,019)	0,67 (0,033)	6,4 (0,79)	213
cinosulfurão					
Mo222	0,23 (0,086)	0,02 (0,002)	0,78 (0,056)	0,4 (1,24)	-
Mo260	0,32 (0,046)	0,005 (0,0029)	0,81 (0,293)	2,2 (1,24)	6
Sa88	0,74 (0,111)	0,008 (0,0012)	0,48 (0,129)	2,8 (0,06)	7
So307	0,63 (0,082)	0,005 (0,0022)	0,72 (0,103)	7,8 (0,71)	20
etoxisulfurão					
Mo222	0,16 (0,176)	0,01 (0,006)	0,46 (0,018)	0,22 (1,065)	-
Mo260	0,69 (0,065)	0,01 (0,005)	0,39 (0,011)	3,5 (1,07)	16
Sa88	0,66 (0,235)	0,02 (0,018)	0,42 (0,038)	2,41 (1,264)	11
So307	1,18 (0,069)	0,002 (0,0088)	0,47 (0,008)	12,1 (1,07)	55
metsulfurão-metilo					
Mo222	0,20 (0,044)	0,02 (0,002)	0,35 (0,032)	0,05 (1,065)	-
Mo260	0,24 (0,048)	0,01 (0,001)	0,44 (0,104)	0,04 (1,166)	0,8
Sa88	0,47 (0,072)	0,02 (0,002)	0,55 (0,065)	0,06 (1,181)	1,2
So307	0,69 (0,154)	0,01 (0,002)	0,37 (0,124)	0,05 (1,698)P	1
imazetapir					
Mo222	0,32 (0,44)	0,01 (0,00096)	0,42 (0,55)	0,14 (8,780)	-
Mo260	0,37 (0,14)	0,009 (0,0012)	0,39 (0,12)	0,23 (1,553)	1,6
Sa88	0,14 (0,084)	0,01 (0,001)	0,16 (0,054)	0,90 (1,105)	6,4
So307	0,98 (0,21)	0,02 (0,002)	0,81 (0,58)	0,17 (3,402)	1,2

Continua

Quadro 5 - (Continuação) Parâmetros da regressão não linear estimados (SE entre parêntesis^a) pelo modelo logístico^b, para a resposta do peso verde (g) de quatro populações de *A. plantago-aquatica* a doses crescentes de herbicidas alternativos ao bensulfurão-metilo

Herbicida População	b	c (g)	d (g)	ED ₅₀ (g ha ⁻¹)	NR <u>ED₅₀ (r)</u> ED ₅₀ (S)
bentazona					
Mo222	0,37 (0,077)	0,006 (0,0032)	0,21 (0,009)	2,95 (1,075)	
Mo260	0,65 (0,250)	0,003 (0,0035)	0,17 (0,010)	1,72 (1,358)	0,58
Sa88	0,22 (0,063)	0,004 (0,0032)	0,14 (0,009)	5,17 (1,128)	1,75
So307	0,18 (0,236)	0,005 (0,0030)	0,13 (0,009)	4,28 (1,108)	1,45
MCPA					
Mo222	0,17 (0,110)	0,005 (0,0033)	0,13 (0,009)	2,71 (1,088)	-
Mo260	2,32 (0,297)	-0,007 (0,0026)	0,48 (0,136)	0,16 (3,472)	0,06
Sa88	0,93 (0,117)	0,002 (0,0004)	0,16 (0,028)	2,31 (1,455)	0,9
So307	1,73 (0,2731)	-0,0041 (0,0027)	0,48 (0,105)	0,64 (2,438))	0,24
propanil					
Mo222	0,43 (0,121)	0,003 (0,0003)	0,05 (0,007)	18,00 (1,261)	-
Mo260	1,03 (0,364)	0,003 (0,0008)	0,25 (0,064)	2,27 (3,449)	0,13
Sa88	1,34 (0,114)	0,0003 (0,00018)	0,09 (0,012)	7,12 (1,456)	0,4
So307	0,15 (0,062)	0,007 (0,0013)	0,15 (0,019)	15,3 (1,09)	1

metilo e o bensulfurão-metilo nas populações de *A. plantago-aquatica* portuguesas. A resposta ao imazetapir foi significativamente diferente entre populações: enquanto a So307 ($NR=1,2$) e a Mo260 ($NR=1,6$) não apresentaram resistência cruzada, a Sa88 apresentou ($NR=6,4$).

Pode-se concluir que neste ensaio, as três populações de *A. plantago-aquatica* apresentam resistência cruzada a todas as sulfonilureias estudadas, excepto ao metsulfurão-metilo, embora com diferentes níveis de resistência.

No que respeita aos herbicidas que não

inibem a ALS, como a bentazona, o MCPA e o propanil verificou-se que, para qualquer das populações estudadas, os valores do NR foram próximos ou inferiores à unidade o que confirma a não existência de resistência cruzada para herbicidas com modo de acção diferente do bensulfurão-metilo.

O padrão de resistências cruzadas, das populações de *Alisma plantago-aquatica*, foi semelhante ao referido por outros autores. Biótipos R a sulfonilureias de espécies infestantes do arroz, como *A. plantago-aquatica*, *Lindernia attenuata*, *Lindernia dubia*, *Lindernia micrantha*, *Lindernia procubens*,

Linnophila sessiflora, *Monochoria korsakowii*, *Monochoria vaginalis* e *Schoenoplectus mucronatus* (Wang *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1999; Sattin *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Uchino *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2001; Kuk *et al.*, 2003) apresentavam resistência cruzada a sulfonilureias como o azimsulfurão, o cinosulfurão, o etoxisulfurão, o imazosulfurão, o ciclosulfurão e o pirazosulfurão-etilo e herbicidas com modo de acção diferente como a bentazona, o pretilacloro e o MCPA, entre outros, mantiveram a sua eficácia sobre o biótipo resistente. A resistência cruzada a outros herbicidas inibidores da ALS, como as imidazolinonas, depende da espécie e da substância activa. Enquanto os biótipos de *Cyperus difformis* e de *Monochoria vaginalis* R a sulfonilureias apresentaram resistência cruzada ao imazapir mas não à imazaquina (Hwang *et al.*, 2001; Kuk *et al.*, 2003; 2004), os biótipos de *Rotala indica* (Willd.) Koene, da família Lythraceae, apresentaram resistência cruzada a ambos (Kuk *et al.*, 2002).

Analisando estes dados no conjunto, independentemente das populações terem origem em arrozais de diferentes regiões geográficas separadas por considerável distância, todas apresentam resistência ao bensulfurão-metilo e um padrão de resistência cruzada similar. No entanto registaram-se diferenças significativas quando se quantificou a magnitude da resistência através do *NR*.

Os *NR* e os padrões de resistência cruzada a herbicidas inibidores da ALS podem variar muito entre espécies mas também entre populações da mesma espécie, o que pode ser atribuído não só à pressão de selecção mas também à hereditariedade da resistência e às características de autogamia e alogamia da espécie.

A intensidade da pressão de selecção pode ter afectado a frequência da resistência ou o grau de heterozigocidade de cada população. De facto, a história dos campos de cultura

parece apontar para um paralelismo entre o aumento da pressão de selecção (número de anos de aplicação consecutiva de sulfonilureias e herbicidas aplicados) e o nível de resistência (*NR*). A resistência foi descoberta em campos tratados consecutivamente com bensulfurão-metilo durante mais de três anos seguidos. As populações provenientes de campos tratados exclusivamente com herbicidas mistos contendo bensulfurão-metilo e molinato (So307 e So306) apresentaram *NR* significativamente superiores aos de populações tratadas com herbicidas mistos contendo bensulfurão-metilo, mefenaceto e molinato (Sa88 e Mo260). A população Mo190, que provinha de um campo em que a aplicação com herbicidas mistos, durante seis anos seguidos era complementada anualmente com a utilização subsequente de bentazona, não apresentou resistência ao bensulfurão-metilo (*NR*=1). Este facto comprova que misturas (bensulfurão-metilo e mefenaceto) e aplicações sequenciais (bensulfurão-metilo e bentazona) de herbicidas com modo de acção diferente das sulfonilureias contribuem de facto para reduzir a pressão de selecção (Sa88 e Mo260) e retardar a ocorrência de resistência (Mo190).

A aplicação das misturas contendo dois herbicidas, designadamente o bensulfurão-metilo e o mefenaceto, ambos activos sobre *A. plantago-aquatica* embora com diferente eficácia, seria a principal responsável pela menor intensidade de pressão de selecção que ocorreu nos campos com as populações Sa88 e Mo260. Em situações como estas dominaria o genótipo heterozigótico, cuja resposta ao herbicida seria intermédia entre o homozigótico dominante (R) e o homozigótico recesivo (S) (Shaner, 1995; Lorraine-Colwill *et al.*, 2001), considerando que a resistência às sulfonilureias é governada por um único gene nuclear e semidominante (Saari *et al.*, 1994).

CONCLUSÕES

Os estudos realizados com populações de *Alisma plantago-aquatica* de diferentes origens geográficas permitiram chegar às seguintes conclusões:

Confirmação de quatro populações resistentes ao bensulfurão-metilo (Mo260, Sa88, So306 e So307) e de uma população susceptível (Mo190).

A magnitude da resistência ao bensulfurão-metilo, calculada a partir dos valores de $NR (ED_{50} R/S)$, variou com o estado fenológico e a origem geográfica.

A influência do estado fenológico na sensibilidade ao bensulfurão-metilo foi mais evidente nas populações R do que nas populações S. As plantas com seis filódios expandidos (24-43 DAT) das populações R eram 80 a 99% mais resistentes ao bensulfurão-metilo do que plantas no estado fenológico de seis filódios expandidos (14-21 DAT), enquanto as populações S foram apenas quatro vezes mais susceptíveis. As plantas menos desenvolvidas (BBCH 116) apresentaram maior susceptibilidade ao bensulfurão-metilo do que plantas mais desenvolvidas; apesar do estado fenológico ter influenciado a magnitude da resistência das diferentes populações de *A. plantago-aquatica*, o nível de resistência calculado é suficiente para que a resistência se manifeste no campo.

A influência do estado fenológico na magnitude da resistência salienta a importância da normalização dos métodos de detecção de resistência, de forma a obter resultados fiáveis e comparáveis entre laboratórios. Recomenda-se a utilização da mesma população susceptível de referência, de preferência com a mesma origem geográfica das populações resistentes e fazer a aplicação do herbicida em estados fenológicos comparáveis aos da aplicação nas condições reais de campo.

As populações de arrozais da bacia

hidrográfica do rio Sorraia, So307 e So306 e a da bacia hidrográfica do rio Sado, Sa88, foram as mais resistentes, e provinham de regiões sujeitas a maior pressão de selecção onde o risco de resistência era maior, do que a população do arrozal da bacia hidrográfica do rio Mondego (Mo260).

O padrão de resistência cruzada identificado nas populações de *Alisma plantago-aquatica* estudadas corresponde ao registado para outros biótipos de infestantes resistentes a sulfonilureias. Houve resistência cruzada para o azimsulfurão, cinosulfurão e etoxisulfurão, com diferentes NR mas não para o metsulfurão-metilo. Outros herbicidas inibidores da ALS como o imazetapir manifestaram resistência cruzada na população Sa88, mas não nas populações So307 e Mo260. O imazapir por seu lado foi eficaz sobre a população So307.

Herbicidas com modo de acção diferente, como a bentazona, o MCPA, o oxadiazão e o propanil, mantiveram a sua eficácia e podem constituir herbicidas alternativos para o combate a populações de *A. plantago-aquatica* resistentes ao bensulfurão-metilo.

Os elevados níveis de resistência ao bensulfurão-metilo e o padrão de resistências cruzadas circunscrito a algumas sulfonilureias, confirmados nas populações de *A. plantago-aquatica* estudadas, sugerem que o mecanismo de resistência ao bensulfurão-metilo, seja do tipo alteração do local de acção, provocada pela insensibilidade da enzima ALS.

As recomendações a incluir em estratégias de gestão e prevenção da resistência ao bensulfurão-metilo, devem ser feitas caso a caso, mas de uma forma geral: a) a aplicação dos herbicidas deve ser realizada o mais cedo possível, para atingir as plântulas de *A. plantago-aquatica* em fases de desenvolvimento muito precoces de modo a obter a maior eficácia; b) proceder sempre que possível à alternância com herbicidas com modo de

acção diferente dos inibidores da ALS. Os resultados apresentados e a bibliografia consultada salientam, contudo, que determinados herbicidas inibidores da ALS podem manter a sua eficácia sobre os biótipos R, como o metsulfurão-metilo. Esta situação depende do tipo de mutação que ocorre na enzima-alvo (ALS) conferindo resistência cruzada a determinados compostos e não a outros, consoante os aminoácidos que são substituídos na mutação.

À medida que mais casos de resistência foram estudados verificou-se que a relação pré-definida entre as mutações, os níveis de resistência e as resistências cruzadas (Devine & Eberlein, 1997; Boutsalis *et al.*, 1999; Tranel *et al.*, 2006) não se podia generalizar. A partir do momento em que a resistência por alteração do local de acção estiver confirmada torna-se necessário incluir nos estudos de resistência cruzada, maior número de sulfonilureias e outros herbicidas inibidores da ALS (Roux *et al.*, 2005), pois quando o mecanismo de resistência é deste tipo, por insensibilidade da enzima-alvo, é entre os herbicidas inibidores da ALS que as resistências cruzadas são mais difíceis de prever (Sibony *et al.*, 2001).

AGRADECIMENTOS

Estes estudos foram financiados pelos projectos PAMAF-1017, “Resistência Adquirida a Herbicidas na Cultura do Arroz” e Agro-16 “Redução do Risco de Resistência Adquirida a Herbicidas por Infestantes de Diferentes Culturas”. Expressamos os nossos agradecimentos ao Professor Catedrático Emérito António St’Aubyn pela revisão do texto e sugestões apresentadas no âmbito da análise estatística em especial da regressão não linear.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boutsalis, P.; Karotam, J. & Powles, S.B. (1999) - Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Science* 55: 507-516.
- Brown, H.M. (1990) - Mode of action; crop selectivity and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science* 29: 263-281.
- Busi, R.; Vidotto, F.; Ferrero, A.; Fischer, A.J.; Osuna, M.D. & Deprado, R. (2004) - Patterns of resistance to ALS-inhibitors in *Cyperus difformis* and *Schoenoplectus mucronatus* at whole plant level. *Proceedings of the MedRice Conference – Challenges and Opportunities for Sustainable Rice-Based Production Systems*. Torino, Italy, pp. 27-31.
- Calha, I.M.; Machado, C. & Rocha, F. (1995) - A survey of herbicide-resistant weeds in Portuguese fields. *In: Proceedings International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Cordoba, Spain, pp. 223-226.
- Calha, I.M.; Machado, C. & Rocha, F. (1999) - Resistance of *Alisma plantago-aquatica* to sulfonylurea herbicides in Portuguese rice fields. *Hydrobiologia* 415: 289-293.
- Chow, G.C. (1960) - Tests of equality between sets of coefficients in two linear regressions. *Econometrics* 28:591-605.
- Cobbs, A. (1992). *Herbicides and Plant Physiology*. 1ª Ed. Chapman and Hall. Londres, 176 pp.
- Cotterman, J.C. & Saari, L.L. (1992) - Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlor-sulfuron resistance in diclofop-methyl resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 43:182-192.
- Coutinho, A.X. Pereira (1974) - *Flora de Portugal*. Palhinha RT (ed.) 2ª Ed. Verlag Van J., Cramer. 938 pp.
- Crowley, M.J. (2005) - *Statistics: an introduction using R*. Wiley.
- DePrado, R.; Lopez-Martinez, N. & Gimenez-Espinosa, R. (1997) - Herbicide-resistant weeds in Europe: agricultural; physiological and biochemical aspects:17-28. *In: DePrado, R.; Jorriin, J. & Garcia-Torres, L. (Eds.) - Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Kluwer, Dordrecht. The Netherlands, 340 pp.
- Devine, M.D. & Eberlein, C.V. (1997) - Physiological; biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. *In: Roe, R.M.; Burton, J.D. & Kuhr, R.J. (Eds.) - Herbicide Activity: Toxicology; Biochemistry*

- and *Molecular Biology*. IOS Press. Amsterdam, The Netherlands, pp. 159-186
- Devine, M.D. & Preston, C. (2000) - The molecular basis of herbicide resistance. In: Cobb, A.H. & Kirkwood, R.C. (Eds.) - *Herbicides and their mode of action*. Sheffield; Great Britain; Sheffield Academic, pp. 72-104.
- DGPC (1997) - *Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos - Lista dos Produtos com Venda Autorizada*. MADRP, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, 158 pp.
- DGPC (2006) - *Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos - Lista dos Produtos com Venda Autorizada*. MADRP, Direcção Geral de Protecção das Culturas, 170 pp.
- Duke, S.O. & Dayan, F.E. (2001) - Classification and mode of action of herbicides. In: DePrado, R. & Jorrián, J.V. (Eds.) - *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*, pp. 31-44. Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones, 688 pp.
- FAO (2003) - FAOSTAT Agriculture Data. FAO Rome. Disponível em <<http://www.fao.org>>. (Acesso em 28.05.04.)
- FITOGEST (2006) - *Ricerca per impiego* (preparati). Disponível em www.fitogest.imagelinenet.com. (Acesso em 21/03/06.)
- Forlani, G.; Nielseren, F.; Landi, P. & Tuberosa, R. (1991) - Chlorsulfuron tolerance and acetolactate synthase activity in corn (*Zea mays* L.) inbred lines. *Weed Science* 39:553-557.
- Graham, R.J.; Pratley, J.E.; Slater, P.D. & Baines, P.R. (1996) - Herbicide – resistant aquatic weeds; a problem in New South Wales rice crops. *Proceedings 11th Australian Weeds Conference*. Melbourne, Australia, pp. 156-158.
- Gressel, J. (2002) - *Molecular Biology of Weed Control*. London. Taylor and Francis Group, London, UK, 504 pp.
- Heap, I. (2005) - Criteria for confirmation of Herbicide-Resistant weeds – with specific emphasis on confirming low level resistance. Documento disponível em <<http://www.weedscience.com>> (acesso 02.01.06.)
- Heap, I. (2006) - *International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. Documento disponível em: <<http://www.weedscience.com>> (acesso em 23.09.03.)
- Hinz, J.R.R. & Owen, M.D.K. (1977) - Acetolactate-synthase resistance in a common waterhemp (*Amaranthus rudis*) population. *Weed Technology* 11:13-18.
- Hrac (1998) - *Classification of Herbicides According to Mode of Action*. Herbicide Resistance Action Committee Set 98 updated.
- Huet, S.; Bouvier, A.; Gruet, M.A. & Jolivet, E. (2003) - *Statistical Tools for Nonlinear Regression*. Springer, New York.
- Hwang, I.T.; Lee, K.H.; Park, S.H.; Lee, B.H.; Hong, K.S.; Han, S.S. & Cho, K.Y. (2001) - Resistance to acetolactate synthase inhibitors in a biotype of *Monochoria vaginalis* discovered in Korea. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71: 69-76.
- Itoh, K.; Wang, G.X. & Ohba, S. (1999) - Sulfonylurea resistance in *Lindernia micrantha* an annual paddy weed in Japan. *Weed Research* 39: 413-423.
- Kudsk, P.; Mathiassen, S.K. & Cotterman, J.C. (1995) - Sulfonylurea resistance in *Stellaria media* (L.) Vill. *Weed Research* 35: 19-24.
- Kuk, Y.I.; Kwon, O.D.; Jung, H.I.; Burgos, N.R. & Guh, J.O. (2002) - Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Rotala indica* resistant to imazosulfuron in Korea. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74: 129-138.
- Kuk, Y.I.; Jung, H.I.; Kwon, O.D.; Lee, D.J.; Burgos, N.R.; & Guh, J.O. (2003) - Sulfonylurea herbicide-resistant *Monochoria vaginalis* in Korean rice culture. *Pest Management Science* 59: 949-961.
- Kuk, Y.I.; Kyung, H.K.; Oh, D.K.; Do, J.L.; Nilda, R.B.; Sunyo, J. & JA, O.G. (2004) Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Cyperus difformis* resistant to sulfonylurea herbicides in Korea. *Pest Management Science* 60: 85 - 94
- Leah, J.M.; Caseley, J.C.; Riches, C.R. & Valverde, B. (1994) - Association between elevated activity of arylacylamidase and propanil resistance in jungle rice *Echinochloa colona*. *Pesticide Science* 42: 281-289.
- Lorraine-Colwill, D.F.; Powles, S.B.; Hawkes, T.R. & Preston, C. (2001) - Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.). *Theoretical and Applied Genetics* 102: 545-550.
- Mallory-Smith, C.A. & Retzinger, E.J. (2003) - Revised classification of herbicide by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology* 17: 605-619
- Mallory-Smith, C.A.; Thill, D.C. & Dial, M.J. (1990) - Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* 4: 163-168.
- Matias, A.M. (2005) - *Métodos expeditos para confirmação da resistência ao bensulfurão-metilo em *Alisma plantago-aquatica**. Trabalho de fim de curso de Engenharia Agronómica. Universidade de Évora, 197 pp.
- Meier, U. (1997) - Growth stage of mono- and dicotyledonous plants. *BBCB-Monograph*. Blackwell, Berlin-Wien. 622 pp.

- Moss, S.R. (2002) - Experience with herbicide resistance in Europe: global implications. *Proceedings of the 13th Australian Weeds Conference*: 660-665.
- Moss, S.R. (2005) - Herbicide resistance; integrated weed management and Atlantis® use in UK. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 58; 2: 271-282.
- Munscher, W.C. (1936) - Storage and germination of seeds of aquatic plants. *Cornell University Agronomy Experimental Station Bulletin* 652.
- NC – IUBMB (2002) - Enzyme nomenclature – Supplement 8. Documento disponível em: <www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/supplement/sup8/> (acesso em 25.07.05.)
- 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: 9 -17.
- Pappas-Fader, T.; Cook, J.F.; Butler, T.; Lana, P.J. & Hare, J. (1993) - Resistance of California arrowhead and smallflower umbrella plant to sulfonylurea herbicides. *Proceedings of the Western Weed Science Society* (Newark, CA: Western Society of Weed Science); 76.
- Park, T.S.; Kim, S.C.; Park, J.E.; Oh, Y.K. & Kim, K.U. (1999) - Sulfonylurea-resistant biotype of *Monochoria korsakowii* in reclaimed paddy fields in Seosan, Korean. *Korean Journal Weed Science* 19: 340-344.
- Primiani, M.M.; Cotterman, J.C. & Saari, L.L. (1990) - Resistance of Kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Weed Technology* 4: 169-172.
- Ritz, C. & Steibig, J.C. (2005) - Biossays Analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12. Documento disponível em URL <http://www.bioassay.dk> (acesso em 11.04.05.)
- Ritz, C.; Streibig, J.C. & Cedergreen, N. (2004). Statistical assessment of dose-response curves with free software – collection of examples. Short Course; 13^a Symposium EWRS. Italy, 33 pp.
- Rocha, F. (1996) - *Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal* – Protecção da Produção Agrícola – Edição Especial. MADRP, Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC), Oeiras, 591 pp.
- Rocha, F. (1999) - *Relatório do projecto PAMAF-IED 1017* “Resistência Adquirida a Herbicidas na Cultura do Arroz. Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC), Oeiras.
- Roux, F.; Matejcek, A. & Reboud, X. (2005) - Response of *Arabidopsis thaliana* to 22 ALS inhibitors: baseline toxicity and cross-resistance of csr1-1 and csr1-2 resistant mutants. *Weed Research*. 45: 220-227.
- Rubin, B. (1991) - Herbicide resistance in weeds and crops; progress and prospects. In: Caseley JC; Cussans GW & Atkin RK (Eds.). *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*. Long Ashton International Symposium. Butterworth-Heinemann Ltd. 513 pp.
- Saari, L.L.; Cotterman, J.C. & Thill, D.C. (1994) - Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibiting herbicides: 83-140. In: SB Powles & JAM Holtum (Eds.) - *Herbicide Resistance in Plants - Biochemistry and Physiology*, CRC Press. Boca Raton, FL., USA.
- Sattin, M.; Berto, D.; Zanin, G. & Tabacchi, M. (1999) - Resistance to ALS inhibitors of rice in north-western Italy. *Proceedings Brighton Crop Protection conference – Weeds*. Brighton, UK, pp. 783-790.
- Schloss, J.V. (1990) - Acetolactate synthase; mechanism of action and its herbicide binding site. *Pesticide Science* 29: 283-292.
- Seefeldt, S.S.; Jensen, J.E. & Fuerst, E.P. (1995) - Log-logistic analysis of dose-response relationships. *Weed Technology* 9:218-227.
- Shaner, D.L. (1995) - Studies on mechanisms and genetics of resistance: their contribution to herbicide resistance management. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, pp. 537-546.
- Sibony, M. & Rubin, B. (2003) - Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). *Planta* 216: 1022-1027.
- Sibony, M.; Michel, A.; Haas, H.u.; Rubin, B. & Hurlle, K. (2001) - Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus*: cross resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Research* 41: 509-522.
- Steel, R. & Torrie, J. (1980) - *Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach*. 2^a ed. McGraw Hill, 633 pp.
- Streibig, J.C. (1992) - *Quantitative Assessment of Herbicide Phytotoxicity with Dilution Assay*. Department of Agricultural Sciences. Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, 98 pp.
- Streibig, J.C.; Rudemo, M. & Jensen, J.E. (1993) - Dosage-response curves and statistical models:29-55. In: Streibig, J.C. & Kudsk, P. (Eds.) - *Herbicide Bioassays*. CRC Press, Boca Raton, FL. USA.
- Tranel, P.J. & Wright, T.R. (2002) - Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50: 700-712.

- Tranel, P.J.; Wright, T.R. & Heap I.M. (2006) - Als mutations from herbicide-resistant weeds. Disponível em <<http://www.weedscience.com>> (acesso em 03/03/06.)
- Uchino, A.; Itoh, K.; Wang, G.X.; Tachibana, M. & Wang, G.X. (2000) - Sulfonylurea resistant biotypes of *Lindernia* species in the Tohoku region and their response to several herbicides. *Journal Weed Science Technology* 45: 13-20.
- Usui, K. (2001) - Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. *Weed Biology and Management* 1: 137-146
- Viggiani, P.; Tabacchi, M. & Angelini, R. (2003) - *Vegetazione Spontanea di Risaie e Canali*. Ed. Informatori Agrário. Bayer Crop Science 375 pp.
- Wang, G.X.; Kohara, H. & Itoh, K. (1997). Sulfonylurea resistance in a biotype of *Monochoria korsakowii*; an annual paddy weed in Japan. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference – Weeds*. Brighton, UK, pp. 311-318.
- Wang, G.X.; Watanabe, H.; Uchino, A. & Itoh, K. (2000) - Response to sulfonylurea (SU)-resistant biotype of *Linnophila sessiliflora* to selected SU and alternative herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68: 59-66.
- Wrubel, R.P. & Gressel, J. (1994) - Are herbicide mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance? a case study. *Weed Technology* 8: 635-648.