

DANILO CARVALHO PEREIRA DA SILVA

**ESTRUTURA GENÉTICA E RESPOSTA À SELEÇÃO POR HERBICIDA
GLIFOSATO EM POPULAÇÃO DE *Eleusine indica* (L.) Gaertn**

Botucatu

2026

DANILO CARVALHO PEREIRA DA SILVA

**ESTRUTURA GENÉTICA E RESPOSTA À SELEÇÃO POR HERBICIDA
GLIFOSATO EM POPULAÇÃO DE *Eleusine indica* (L.) Gaertn**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agricultura (Proteção de plantas).

Orientador: Caio Antonio Carbonari

Coorientador(a): Evandro Vagner
Tambarussi

Botucatu

2026

S586e Silva, Danilo Carvalho Pereira da
Estrutura genética e resposta à seleção por herbicida
glifosato em população de *Eleusine indica* (L.) Gaertn / Danilo
Carvalho Pereira da Silva. -- Botucatu, 2026
144 p. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Caio Antonio Carbonari
Coorientador: Evandro Vagner Tambarussi

1. Seleção. 2. Genética quantitativa. 3. Evolução. 4. Ervas
daninhas. 5. Herbicidas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTRUTURA GENÉTICA E RESPOSTA À SELEÇÃO POR
HERBICIDA GLIFOSATO EM POPULAÇÃO DE Eleusine indica (L.) Gaertn

AUTOR: DANILO CARVALHO PEREIRA DA SILVA
ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI
COORDENADOR: EVANDRO VAGNER TAMBARUSSI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI (Participação Presencial)
Diretoria / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA
Pesquisador Dr. MARCELO RODRIGUES ALVES DE FIGUEIREDO (Participação Presencial)
Crop Protection R&D / Bayer
Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA

Botucatu, 16 de julho de 2026.

Aos Meus Pais:

Janine M. C. Da Silva E Danilo P. da Silva

Pelo apoio incondicional

A minha amada esposa e filha,

Paula e Helena,

dedico

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Caio Antonio Carbonari e Evandro Vagner Tambarussi, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência e exemplo de dedicação à docência e à pesquisa.

A todos os integrantes do NUPAM – Grupo de Pesquisas Avançadas em Matologia, em especial a Raphael Negrisoni, Renato Costa, Alysson Dalmas e Augusto Giocondo pelo apoio e convivência ao longo desta trajetória.

Ao LAMPAF – Grupo de Estudos e Pesquisas do Laboratório de Melhoramento de Plantas Agrícolas e Florestais da UNESP/FCA, em especial a Tharcísio Trindade Oliveira, pelo apoio, colaboração.

À TechField – Assessoria e Consultoria Agrícola, especialmente na pessoa do Dr. Eduardo Negrisoni, pelos conselhos e pela ajuda ao longo desta trajetória.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Se as coisas são

Inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

Mario Quintana.

RESUMO

A resistência de plantas daninhas a herbicidas constitui um processo evolutivo resultante da seleção de fenótipos capazes de sobreviver sob pressão química recorrente. Nesta dissertação, avaliou-se a estrutura genética e a resposta à seleção por glifosato em uma população de *Eleusine indica*, com ênfase na comparação entre métodos de amostragem, na detecção precoce da resistência funcional e na estimativa do potencial evolutivo ao longo de um gradiente de doses. Para isso, foram utilizadas 19 progênies maternas e sete doses de glifosato, permitindo comparar a abordagem tradicional baseada em bulk de sementes com a abordagem baseada em progênies individuais. Os resultados demonstraram que o método de amostragem afeta significativamente a caracterização fenotípica da resistência, uma vez que o bulk mascara parte da heterogeneidade intrapopulacional revelada pelas progênies. A aplicação do conceito de Estado Operacional de Resistência (R^*) mostrou-se eficiente para o diagnóstico precoce, confirmando a presença de resistência funcional ao glifosato em baixa frequência na população avaliada, com destaque para a Família 27, classificada como R^* na dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹. O particionamento da variância indicou que o potencial evolutivo não é uniforme ao longo do gradiente de seleção, atingindo seu máximo justamente na dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹, na qual foram observados os maiores valores de herdabilidade, variância genética aditiva e evolvabilidade. Em contraste, doses extremas reduziram drasticamente a variabilidade e comprimiram a resposta fenotípica. Conclui-se que a abordagem baseada em progênies maternas amplia a sensibilidade diagnóstica, que o critério R^* é promissor para vigilância precoce da resistência e que existe uma janela crítica de seleção em que o aumento da dose pode, paradoxalmente, acelerar a evolução da resistência.

Palavras-chave: resistência a herbicidas; glifosato; *Eleusine indica*; evolvabilidade; estado operacional de resistência.

ABSTRACT

Herbicide resistance in weeds is an evolutionary process driven by the repeated selection of phenotypes able to survive under intense chemical pressure. This dissertation evaluated the genetic structure and the response to glyphosate selection in a population of *Eleusine indica*, focusing on the comparison of sampling methods, the early detection of functional resistance, and the estimation of evolutionary potential across a dose gradient. Nineteen maternal progenies and seven glyphosate doses were used to compare the traditional bulk-seed approach with a progeny-based approach. The results showed that the sampling method significantly affects the phenotypic characterization of resistance, since the bulk approach masks part of the intrapopulation heterogeneity revealed by individual progenies. The application of the Operational Resistance State (R^*) concept proved effective for early diagnosis, confirming the presence of functional glyphosate resistance at low frequency in the evaluated population, with Family 27 classified as R^* at the dose of 2.160 g a.e. ha⁻¹. Variance partitioning demonstrated that evolutionary potential is not uniform across the selection gradient and reaches its maximum at 2.160 g a.e. ha⁻¹, where the highest values of narrow-sense heritability, additive genetic variance, and evolvability were observed. In contrast, extreme doses sharply reduced variability and compressed the phenotypic response. It is concluded that the maternal progeny-based approach increases diagnostic sensitivity, that the R^* criterion is a promising tool for early resistance surveillance, and that a critical selection window exists in which increasing the herbicide dose may paradoxically accelerate the evolution of resistance. [

Keywords: herbicide resistance; glyphosate; *Eleusine indica*; evolvability; operational resistance state.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – Da reação à previsão: um modelo conceitual ecoevolutivo unificado

Figura 1 - Fluxo operacional do framework eco-evolutivo para monitoramento e previsão da resistência a herbicidas 36

CAPÍTULO 2 – Caracterização fenotípica da resistência ao glifosato: impacto do método de amostragem (Bulk vs. Progênes) em *Eleusine indica* (L.) Gaertn

Figura 1 - Curvas de dose-resposta (modelo log-logístico LL.4) comparando a redução da biomassa relativa de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) em resposta a doses crescentes do herbicida glifosato 72

CAPÍTULO 3 – Estado Operacional de Resistência (R^*) em *Eleusine indica* (L.) Gaertn

Figura 1 - Mapa de Risco R^* 92

CAPÍTULO 4 – Subdose biológica e potencial evolutivo acessível em progênes de *Eleusine indica* (L.) Gaertn sob glifosato

Figura 1 - Relação entre o gradiente de dose de glifosato, a biomassa seca relativa média (MSR) e a evolvabilidade média-padronizada (IA) em *Eleusine indica* 111

Figura 2 - Distribuição individual da biomassa seca relativa (MSR) por progênie materna de *Eleusine indica* na dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ de glifosato .. 115

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Da reação à previsão: um modelo conceitual ecoevolutivo unificado

Tabela 1 – Comparação entre abordagens genômicas populacionais e a estrutura proposta de Estado Operacional de Resistência (R^*)..... 49

CAPÍTULO 2 – Caracterização fenotípica da resistência ao glifosato: impacto do método de amostragem (Bulk vs. Progênes) em *Eleusine indica* (L.) Gaertn

Tabela 1 – Testes de Razão de Verossimilhança (LRT) para comparação dos parâmetros do modelo log-logístico de quatro parâmetros (LL.4) entre as abordagens de Bulk e Progênes 72

Tabela 2 – Estimativas das doses necessárias para redução de 20 % a 80 % da biomassa (GR20 a GR80), em g e.a. ha^{-1} , utilizando o método de bulk e a média geométrica das Progênes individuais (com Intervalo de Confiança Bootstrap de 95 %) 73

Tabela 3 – Amplitude fenotípica observada entre as 19 progênes avaliadas para os parâmetros de GR50 e GR80 (g e.a. ha^{-1}) 74

CAPÍTULO 3 – Estado Operacional de Resistência (R^*) em *Eleusine indica* (L.) Gaertn

Tabela 1 – Biomassa relativa média (MSR, %) por progênie de *Eleusine indica* na dose discriminatória (2.160 g e.a. ha^{-1}) e classificação R^*/S 90

CAPÍTULO 4 – Subdose biológica e potencial evolutivo acessível em progênes de *Eleusine indica* (L.) Gaertn sob glifosato

Tabela 1 – Médias de biomassa seca relativa (MSR), estatísticas da ANOVA one-way com efeito de progênie e componentes de variância por dose de glifosato em 19 progênes maternas de *E. indica*..... 112

Tabela 2 – Estimativas de σ^2A , h^2 , CVA% e IA na dose 2.160 g e.a. ha^{-1} sob três pressupostos de parentesco entre progênes 113

Tabela 3 – Estimativas de IA na dose 2.160 g e.a. ha⁻¹ com e sem a Família 27.. 114

Tabela 4 – Sensibilidade da classificação R* ao limiar funcional θ na dose 2.160 g e.a. ha⁻¹ (n = 19 progênies maternas)..... 115

Tabela 5 – Comparação dos valores de IA obtidos neste estudo (dose 2.160 g e.a. ha⁻¹) com medianas reportadas por Hansen *et al.* (2011)..... 117

Tabela 6 – Estimativas pontuais de IA por dose (sob m = 4) e correspondente p-valor da ANOVA particionada 117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-Binding Cassette (proteínas transportadoras de efluxo)
ACCase	Acetil-Coenzima A Carboxilase
ALS	Acetolactato Sintase
ANOVA	Análise de Variância (Analysis of Variance)
BBCH	Escala fenológica Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie
Bulk	Mistura de sementes de múltiplos indivíduos (amostragem agrupada)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPSPS	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase
FCA	Faculdade de Ciências Agronômicas
FST	Índice de Fixação Populacional
GBS	Genotyping-by-Sequencing
GST	Glutathione-S-Transferase
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
IC	Intervalo de Confiança
LD₅₀	Dose Letal Mediana (50 % de mortalidade)
LL.4	Modelo Log-Logístico de Quatro Parâmetros
LRT	Teste de Razão de Verossimilhança (Likelihood Ratio Test)
MSR	Massa Seca Relativa (biomassa relativa ao controle)
NTSR	Resistência Não Relacionada ao Sítio-Alvo (Non-Target-Site Resistance)
P450	Citocromo P450 (família de enzimas de detoxificação)

P_{ST}	Variância Fenotípica Padronizada entre Populações
Q_{ST}	Diferenciação Quantitativa entre Populações
R*	Estado Operacional de Resistência
S	Suscetível
TSR	Resistência no Sítio-Alvo (Target-Site Resistance)
UGT	UDP-Glicosiltransferase
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

LISTA DE SÍMBOLOS

θ	limiar funcional para classificação do Estado Operacional de Resistência (R^*)
μ	Média do traço fenotípico
σ_A^2	Variância genética aditiva
σ_{ENTRE}^2	Componente de variância entre progênes
σ_{DENTRO}^2	Componente de variância dentro de progênes (resíduo)
h^2	Herdabilidade no sentido restrito
I_A	Evolvabilidade média-padronizada
I_E	Variância residual padronizada pela média
$CV_A(\%)$	Coeficiente de variação aditiva (em porcentagem)
m	Multiplicador de parentesco entre progênes
n	Número amostral
N	Tamanho efetivo da amostra
F	Estatística F (razão de variâncias da ANOVA)
p	Nível descritivo (p-valor) do teste estatístico
df	Graus de liberdade (degrees of freedom)
GR_{50}	Dose que provoca 50 % de redução de biomassa
GR_{70}	Dose que provoca 70 % de redução de biomassa
GR_{80}	Dose que provoca 80 % de redução de biomassa
$g \text{ e.a. ha}^{-1}$	Gramas de equivalente ácido por hectare
%	Porcentagem
$^{\circ}C$	Graus Celsius
B	Biomassa (do tratamento ou controle, conforme indicado)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	27
	CAPÍTULO 1 - FROM REACTION TO PREDICTION: INTEGRATING PHENOTYPIC SCREENING, DETECTION POWER AND EVLVABILITY IN HERBICIDE RESISTANCE MONITORING.....	30
1. 1	INTRODUÇÃO	30
1. 2	HISTORICAL LIMITATIONS: WHY THE TSR PARADIGM IS INSUFFICIENT	37
1. 3	SPATIAL DYNAMICS AND THE NEED FOR POPULATION TOOLS.....	38
1. 4	THE IMPORTANCE OF EARLY DETECTION AND STRATEGIC SAMPLING.....	39
1. 4.1	WORKED SAMPLING/DETECTION EXAMPLE: EARLY WARNING SENSITIVITY FOR LOW R^* PREVALENCE	42
1. 5	OPERATIONAL RESISTANCE STATE (R^*): A UNIFYING OPERATIONAL UNIT	43
1. 5. 1	DOSE–RESPONSE WORKED EXAMPLE: SMALL CHANGE IN THE AVERAGE VS. INCREASE IN THE UPPER TAIL CAPTURED BY PREVALENCE OF R^*	46
1. 5. 2	SENSITIVITY ANALYSIS: HOW THE CHOICE OF θ ALTERS INFERENCE.	48
1. 6	EVLVABILITY (I_A): KINETIC METRICS FOR PREDICTION	53
1. 6. 1	DEFINING A RISK WINDOW: EXPLICIT DIAGNOSTIC CRITERIA.....	54
1. 6. 2	CHOICE OF TRAIT AND THE BOUNDED-TRAIT PROBLEM.....	55
1. 6. 3	PRACTICAL ESTIMATION OF σA^2 ACROSS MATING SYSTEMS	56
1. 6. 4	INTEGRATION OF R^* AND I_A	57
1. 7	CONCLUSION: TOWARDS EVOLUTIONARILY INTELLIGENT MANAGEMENT.....	57
	REFERENCES.....	61
	CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO: IMPACTO DO MÉTODO DE AMOSTRAGEM (<i>BULK</i> VS. PROGÊNIES) EM <i>ELEUSINE INDICA</i> (L.) GAERTN.....	66
2. 1	INTRODUÇÃO.....	66
2. 2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2. 2. 1	COLETAS DE SEMENTES E FORMAÇÃO DO “ <i>BULK</i> ”	67
2. 2. 2	CURVAS DOSE - RESPOSTA, CONDIÇÕES GERAIS.....	67
2. 2. 3	CURVA DOSE RESPOSTA BASEADA EM PROGÊNIES MATERNAIS	68
2. 2. 4	CURVA DOSE RESPOSTA TRADICIONAL (<i>BULK</i>).....	68

2. 2. 5	OBTENÇÃO DAS CURVAS DOSE RESPOSTAS E <i>GRy</i> (REDUÇÃO DE CRESCIMENTO).....	68
2. 2. 6	COMPARAÇÃO ENTRE ABORDAGENS E QUANTIFICAÇÃO DE INCERTEZA	70
2. 3	RESULTADOS.....	71
2. 3. 1	COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS MODELOS DE DOSE-RESPOSTA.....	71
2. 3. 2	ESTIMATIVAS DE DOSES EFETIVAS E A LIMITAÇÃO DO MÉTODO <i>BULK</i>	73
2. 3. 3	VARIABILIDADE FENOTÍPICA E DIVERSIDADE OCULTA	74
2. 4	DISCUSSÃO	74
2. 4. 1	O EFEITO DE DILUIÇÃO E A MODELAGEM DOSE-RESPOSTA	74
2. 4. 2	IMPLICAÇÕES AGRONÔMICAS: O PERIGO DAS SUB-DOSES E A EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA	75
2. 4. 3	DA VARIABILIDADE FENOTÍPICA PREEXISTENTE À GENÉTICA QUANTITATIVA ..	76
2. 5	CONCLUSÃO	76
	REFERENCIAS	79
	CAPÍTULO 3 - ESTADO OPERACIONAL DE RESISTÊNCIA (R*) EM <i>ELEUSINE INDICA</i> (L.) GAERTN.....	82
3. 1	INTRODUÇÃO	82
3. 2	MATERIAL E MÉTODOS	85
3. 2. 1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	85
3. 2. 2	CONDIÇÕES GERAIS DE APLICAÇÃO E COLETA.....	85
3. 2. 3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DOSES	86
3. 2. 4	OBTENÇÃO DA BIOMASSA RELATIVA (<i>MSR</i>).....	86
3. 2. 5	DEFINIÇÃO DO ESTADO OPERACIONAL DE RESISTENCIA (R*) E CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO	87
3. 2. 6	SENSIBILIDADE AMOSTRAL E PODE DE DETECÇÃO	88
3. 2. 7	ESTIMATIVAS DA FREQUÊNCIA R* E INTERVALOS DE CONFIANÇA	89
3. 3	RESULTADOS.....	89
3. 3. 1	BIOMASSA RELATIVA E CLASSIFICAÇÃO R*/S.....	89
3. 3. 2	FREQUÊNCIA E INTERVALO DE CONFIANÇA R*	91
3. 3. 3	DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA E GRADIENTE DE <i>MSR</i>	91
3. 3. 4	MAPA DE RISCO FENOTÍPICO	92
3. 4	DISCUSSÃO	93
3. 4. 1	CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO NÍVEL POPULACIONAL	93
3. 4. 2	O GRADIENTE DE <i>MSR</i> E A ARQUITETURA GENÉTICA SUBJACENTE	94

3. 4. 3	FREQUÊNCIA DE R* E IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS PARA O MANEJO.....	95
3. 4. 4	A FAMÍLIA 38 COMO ZONA DE TRANSIÇÃO FENOTÍPICA	96
3. 4. 5	LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	97
3. 5	CONCLUSÃO	98
	REFERENCIAS.....	99
CAPÍTULO 4 - SUBDOSE BIOLÓGICA E POTENCIAL EVOLUTIVO		
EM PROGÊNIES DE <i>ELEUSINE INDICA</i> (L.) GAERTN SOB		
GLIFOSATO: UMA RELEITURA QUANTITATIVA DO CONCEITO DE		
	SUBDOSE.....	102
4. 1	INTRODUÇÃO.....	102
4. 2	MATERIAL E METODOS	105
4. 2. 1	MATERIAL VEGETAL E DESENHO EXPERIMENTAL	105
4. 2. 2	CÁLCULO DA BIOMASSA SECA RELATIVA (MSR) E MÉDIA POR DOSE	105
4. 2. 3	COMPONENTES DE VARIÂNCIA E EVOLVABILIDADE.....	106
4. 2. 4	ENQUADRAMENTO FUNCIONAL DA DOSE E DO LIMAR R*	107
4. 2. 5	ANÁLISES DE SENSIBILIDADE.....	108
4. 2. 5. 1	SENSIBILIDADE AO MULTIPLICADOR DE PARENTESCO.	108
4. 2. 5. 2	SENSIBILIDADE À INCLUSÃO DA FAMÍLIA 27.....	109
4. 2. 5. 3	SENSIBILIDADE AO LIMAR FUNCIONAL θ	109
4. 2. 6	CONTEXTUALIZAÇÃO FRENTE À LITERATURA MUNDIAL.....	109
4. 2. 7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	109
4. 3	RESULTADOS	110
4. 3. 1	RESPOSTA MÉDIA DA BIOMASSA AO LONGO DO GRADIENTE	110
4. 3. 2	ESTRUTURA DA VARIÂNCIA GENÉTICA E EVOLVABILIDADE.....	110
4. 3. 3	SENSIBILIDADE AO MULTIPLICADOR DE PARENTESCO	112
4. 3. 4	SENSIBILIDADE À INCLUSÃO DA FAMÍLIA 27	113
4. 3. 5	SENSIBILIDADE AO LIMAR FUNCIONAL θ	114
4. 3. 6	CONTEXTUALIZAÇÃO FRENTE À LITERATURA MUNDIAL.....	116
4. 4	DISCUSSÃO.....	118
4. 4. 1	EVOLVABILIDADE COMO POTENCIAL EVOLUTIVO ACESSÍVEL.....	118
4. 4. 2	DOSE NOMINAL, DOSE EFETIVA E SUBDOSE BIOLÓGICA	119
4. 4. 3	REINTERPRETANDO O CONCEITO DE SUBDOSE EM POPULAÇÕES DE CAMPO	120
4. 4. 4	A FAMÍLIA 27 E A CAUDA SELECIONÁVEL.....	122
4. 4. 5	LIMITE BIOLÓGICO EM DOSE EXTREMA.....	123

4. 4. 6	IMPLICAÇÕES PARA MONITORAMENTO E MANEJO	124
4. 4. 7	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	124
4. 5	CONCLUSÃO	126
	REFERENCIAS	129
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
	REFERÊNCIAS	137

INTRODUÇÃO GERAL

A resistência de plantas daninhas a herbicidas não é uma surpresa. Ela é, em sua essência, a tradução mais direta do que a teoria evolutiva prevê quando uma população geneticamente variável é submetida, de forma repetida e direcional, a um agente seletivo de alta intensidade: o herbicida elimina preferencialmente os indivíduos suscetíveis, e os poucos capazes de sobreviver e reproduzir sob tratamento transmitem essa capacidade às gerações seguintes, enriquecendo progressivamente a frequência de fenótipos tolerantes na população (Jasieniuk *et al.*, 1996; Vencill *et al.*, 2012).

O que a agricultura fez, ao longo de décadas de uso intensivo e repetitivo de moléculas herbicidas, foi transformar cada lavoura em um experimento de seleção artificial não planejado, e a *Eleusine indica* (L.) Gaertn., como tantas outras espécies de plantas daninhas de elevada plasticidade fenotípica e prolífica produção de sementes, respondeu a esse experimento da única forma que a evolução conhece: adaptando-se.

Cinco décadas de registros globais tornaram esse processo inegável. O banco de dados organizado por Heap (2026) documenta mais de 270 espécies com biótipos resistentes a pelo menos um mecanismo de ação, somando mais de 500 casos confirmados mundialmente. O glifosato, herbicida de maior volume de uso na história da agricultura moderna e inibidor da enzima EPSPS, figura entre os produtos com maior número de espécies resistentes registradas, incluindo *E. indica*, cuja resistência ao glifosato já foi confirmada no Brasil e em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Albrecht *et al.*, 2025; Christoffoleti; López-Ovejero, 2004).

No contexto brasileiro, a espécie assume papel central no desafio do manejo de plantas daninhas em culturas de grande expressão econômica, combinando ampla distribuição geográfica, germinação escalonada ao longo do ciclo das culturas e capacidade demonstrada de evoluir resistência múltipla a distintos mecanismos de ação (Albrecht *et al.*, 2025).

Reconhecer a resistência como um processo evolutivo não é apenas uma questão de rigor terminológico. Se a resistência resulta da ação da seleção sobre a variabilidade genética pré-existente na população, então seu diagnóstico e monitoramento não podem se apoiar em métodos que, ao comprimir essa

variabilidade em médias populacionais, tornam invisível exatamente o que importa: a distribuição dos fenótipos nos extremos da calda da curva de resposta.

O método convencional de caracterização da resistência, baseado em amostras compostas de sementes (misturas ou *bulk*), incorre precisamente nesse problema. Ao reunir sementes de múltiplos indivíduos em uma única amostra agregada, esse método dilui a contribuição dos genótipos de maior tolerância na resposta média da população, deslocando os parâmetros estimados da curva dose–resposta em direção à suscetibilidade da maioria. O que um *bulk* oferece é uma descrição estatística da população; o que o manejo evolutivo da resistência exige é a caracterização da estrutura genética da população.

Essa distinção motivou a abordagem experimental desta dissertação. Em lugar de tratar a amostra de sementes como um conjunto anônimo de genótipos, optou-se por preservar a identidade materna de cada planta coletada, conduzindo os experimentos a partir de progênies individuais como unidades genéticas rastreáveis. Esse delineamento, fundamentado nos princípios da genética de populações e da genética quantitativa clássica, permite não apenas comparar curvas dose–resposta entre famílias, mas também particionar a variância fenotípica observada em componentes de origem genética aditiva, o que abre caminho para a estimativa direta do potencial evolutivo da população sob diferentes intensidades de pressão seletiva (Falconer; Mackay, 1996; Houle, 1992).

A pergunta deixa de ser "esta população é resistente ou suscetível?" e passa a ser "quanto potencial genético de resposta à seleção essa população retém ao longo do gradiente de doses?".

É nesse deslocamento de perspectiva que reside o conceito central desta dissertação: o Estado Operacional de Resistência, designado R^* . Proposto como variável funcional de limiar, o R^* classifica cada indivíduo com base em sua capacidade de preservar biomassa mínima para sobrevivência reprodutiva sob a dose de bula do herbicida, transformando um gradiente contínuo de resposta fenotípica em um estado binário operacionalmente definido (Resistente/Suscetível), sem exigir conhecimento prévio do mecanismo molecular envolvido.

Esse limiar não foi escolhido arbitrariamente: ele corresponde ao nível GR_{70} , ponto a partir do qual a divergência fenotípica entre os métodos de amostragem se torna detectável nos dados do presente estudo, e que coincide, como os resultados demonstrarão, com a dose na qual a análise de variância detecta variância genética

entre progênies estatisticamente significativa e a evolvabilidade atinge seu valor máximo ao longo de todo o gradiente experimental.

A evolvabilidade, definida por Houle (1992) como a razão entre a variância genética aditiva e o quadrado da média do traço ($I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$), é a métrica que traduz o potencial de resposta evolutiva da população em termos proporcionais e adimensionais, comparáveis entre diferentes condições ambientais.

Diferentemente da herdabilidade, cujo valor depende da variância total e pode ser artificialmente elevado pela redução da variância ambiental, a evolvabilidade escala a variância genética pelo tamanho da média, tornando-se especialmente sensível em contextos onde a pressão seletiva diminui fortemente o desempenho médio, coincidentemente é exatamente o que ocorre ao longo de um gradiente crescente de doses de herbicida.

A hipótese que organiza esta dissertação é que esse potencial evolutivo não decresce monotonicamente com o aumento da dose: existe, ao contrário, uma janela crítica de pressão seletiva na qual a mortalidade é alta o suficiente para eliminar os suscetíveis, mas insuficiente para purgar a variância genética dos sobreviventes, configurando as condições de máximo risco para a aceleração da resistência.

A presente dissertação está organizada em quatro capítulos que dialogam entre si de forma progressiva. O Capítulo 2 estabelece empiricamente que o método de amostragem altera os parâmetros da curva dose–resposta ao glifosato em *E. indica*, com o *bulk* sendo incapaz de revelar a heterogeneidade genética intrafamiliar que a abordagem por progênies expõe.

O Capítulo 3 aplica o conceito de R^* como ferramenta de diagnóstico precoce, identificando, com base em estatística de eventos raros, o estágio de estabelecimento da resistência funcional na população estudada.

O Capítulo 4 particiona os componentes de variância ao longo do gradiente de doses e estima a evolvabilidade condicionada à intensidade seletiva, identificando empiricamente a dose de máximo risco evolutivo.

O Capítulo 1, por sua vez, sintetiza esses resultados em um modelo conceitual eco-evolutivo unificado, propondo o R^* e a evolvabilidade como instrumentos de uma vigilância preditiva, capaz de antecipar a trajetória evolutiva da resistência antes que o colapso do controle se torne irreversível

CAPÍTULO 1

From Reaction to Prediction: Integrating Phenotypic Screening, Detection Power and Evolvability in Herbicide Resistance Monitoring

1. 1 Introdução

Herbicide resistance is one of the most extensively documented examples of rapid evolution in agroecosystems.¹ In only a few decades, recurrent herbicide application has selected weed populations capable of surviving doses that were previously effective, turning resistance into a simultaneously biological, agronomic and evolutionary problem.^{2,1-3} Traditionally, this process has been interpreted through specific biochemical mechanisms, in particular the distinction between target-site resistance (TSR) and non-target-site resistance (NTSR). This distinction has been and remains fundamental for classifying molecular mechanisms, identifying mutations, understanding cross-resistance patterns and informing management recommendations.^{1,4-7}

However, mechanistic classification alone does not solve a central limitation of monitoring programmes: resistance is typically detected late. In practice, most populations are recognised as resistant only when control failure is already evident in the field, or when dose–response curves reveal clear shifts in parameters such as GR_{50} , LD_{50} or survival at a discriminating dose.⁸⁻¹⁰ Such indicators are robust for confirming established resistance, but become less informative when adaptation is still incipient and confined to a few individuals, families or sub-populations. At that stage, the population mean can remain apparently susceptible while a small fraction of

individuals already expresses functional performance sufficient to survive, regrow or maintain biomass under herbicide selection.⁹

This gap is particularly relevant for NTSR. Unlike many large-effect TSR mutations, non-target-site mechanisms frequently involve metabolic detoxification or alteration of uptake, translocation, sequestration, compartmentalisation and complex regulatory responses.^{6,7,11–15} These mechanisms can produce continuous, quantitative, environment-dependent phenotypic responses rather than discrete categorical classes. As a consequence, individuals within the same population may vary gradually in biomass, partial survival or post-application recovery. Such continuous variation makes it difficult to define when a population should be considered at risk, particularly before resistance manifests as widespread operational failure.^{6,16}

From an evolutionary perspective, however, this heterogeneity is not noise. It is precisely the substrate on which selection acts. Quantitative genetics has long established that continuous traits can respond rapidly to selection when sufficient additive genetic variance is present, even when individual phenotypes do not follow simple Mendelian categories.^{17–20} In weed populations under recurrent herbicide selection, the individuals located in the upper fraction of the phenotypic distribution — those maintaining higher relative biomass, higher survival or better recovery under the selection dose — are systematically favoured.^{21–23} Adaptation can therefore be enriched in a phenotypically superior minority well before any detectable shift of the population mean.^{16,24}

At this point, we reposition the concept of R^* . Here, R^* is not treated as an allele, mutation, molecular marker or universal redefinition of resistance. R^* is defined as a functional resistance state: an operational classification assigned to individuals that

exceed a pre-specified phenotypic threshold under a selection dose. This threshold can be based on survival, relative biomass, normalised dry biomass, post-application recovery or any other functional metric, provided that it is set a priori, biologically justified and accompanied by a sensitivity analysis. Crucially, however, the operational strength of R^* depends on individualised phenotyping and biologically matched normalisation: treated plants should be evaluated individually and, whenever possible, normalised against untreated controls from the same population, maternal family or progeny. This preserves the biological structure of the sample and allows R^* to be derived from a quantitative, individual-level trait rather than from a purely qualitative survival score. When progeny or family structure is retained, the same framework can be extended from prevalence estimation to additive genetic variance and mean-scaled evolvability. R^* therefore does not replace molecular biology; it translates the functional outcome of selection into a measurable variable at the level at which management decisions are taken.

The contribution of R^* is not to rename existing practices, such as discriminating-dose screening or counts of survivors.^{9,10,25} Its contribution is to organise these practices within an explicit eco-evolutionary structure. When the response is strictly binary, R^* converges with survivor frequency. However, when the response is continuous — for example, relative biomass under a selection dose — R^* converts a phenotypic gradient into an estimable functional prevalence with an associated confidence interval and an explicit sampling power.^{8,26} This distinction is critical in populations in which few individuals retain partial performance but no plant fully survives, dies or shifts the dose–response curve detectably.

The central criticism of conventional monitoring is not that it is incorrect, but that it usually leaves the most important sampling question implicit: what is the smallest

phenotypic frequency the design can detect? A small sample can confirm resistance when prevalence is already high, but it can fail to detect rare individuals during the early phase of adaptation. Under a simple binomial detection model, the probability of capturing at least one rare individual depends directly on sample size and the true frequency of the phenotype.^{26–28} Declaring that a population “has no resistance” without making the detection floor of the assay explicit therefore generates a false sense of security. The problem is not only diagnostic; it is statistical and evolutionary.

This is not a hypothetical concern. Three recent Brazilian monitoring surveys, conducted at state and multi-state scales, illustrate the practical consequences of this gap. Martins *et al.*²⁹ screened 93 *Digitaria insularis* populations across western Bahia using 6 or 4 replicates per accession; Oliveira Jr. *et al.*³⁰ reported 492 accessions of *D. insularis* and *Eleusine indica* across five states with 4 replicates per accession; and Markus *et al.*³¹ screened 100 *Echinochloa* populations from Rio Grande do Sul with 8 replicates per accession. Collectively, these surveys represent current best practice in Brazilian weed-resistance monitoring, follow the standardised three-class HRAC scoring (low / medium / high susceptibility) and identified several focal cases of suspected resistance. Yet none of them reports (i) an explicit minimum detectable prevalence per accession, (ii) a sensitivity analysis of the chosen susceptibility threshold²⁵, or (iii) any estimate of additive genetic variance among maternal families.^{20,32} Under a binomial detection model with 95% confidence²⁶, the corresponding designs cannot resolve per-accession phenotypic prevalences below approximately 53% ($n = 4$), 39% ($n = 6$) or 31% ($n = 8$). In other words, the categorical “no resistance detected” outcome in these surveys is mathematically consistent with true prevalences anywhere from 0% to roughly one-third of each accession. The framework

we propose here does not invalidate these efforts — it makes their detection limits explicit and provides a path to extract more inference from the same sampling effort.

Spatial scale compounds the problem. Weed populations are not isolated panmictic units. Fields, paddocks, farms and agricultural regions form metapopulations connected by seed and pollen flow, machinery, management practices and commercial seed networks.^{33–38} Selection can act locally, but dispersal can redistribute adaptive variants regionally. A population with low local R^* prevalence may be the initial focus of an adaptive sweep, whereas similar patterns in disconnected areas may reflect parallel selection rather than common dispersal.^{38,39} Population-genetic tools — spatial structure, F_{ST} , AMOVA, temporal inference, connectivity analyses — are valuable here, but must be interpreted with care when applied to phenotypes in the absence of direct genotyping.^{39–42}

For this reason we treat R^* as an operational bridge, not as a substitute for molecular markers. In studies without genomics, R^* allows estimation of functional phenotypic prevalence, comparison among populations, identification of focal areas and prioritisation of samples for downstream investigation. In studies with genomics, R^* can guide which individuals, families or populations should be genotyped, increasing the efficiency of molecular analyses and reducing the risk of uninformative random sampling. The framework thereby connects low-cost phenotypic screening, evolutionary inference and subsequent genetic validation along a single workflow.

Beyond current prevalence, management programmes need to forecast future response. To this end we incorporate the concept of mean-scaled evolvability, IA , defined as additive genetic variance standardised by the squared phenotypic mean.

^{19,20} Unlike narrow-sense heritability, which expresses the proportion of phenotypic

variance attributable to additive effects, I_A measures the proportional capacity for evolutionary response of a trait. However, I_A must not be interpreted in isolation. High values can reflect a genuine risk window, when meaningful additive genetic variance persists under strong mean suppression, or they can be mathematical artefacts produced by extreme collapse of the trait mean. Any application of evolvability to resistance management must therefore report the trait mean, the additive genetic variance and I_A jointly, and we return to explicit diagnostic criteria for distinguishing real risk windows from variance-collapse artefacts in section 6.

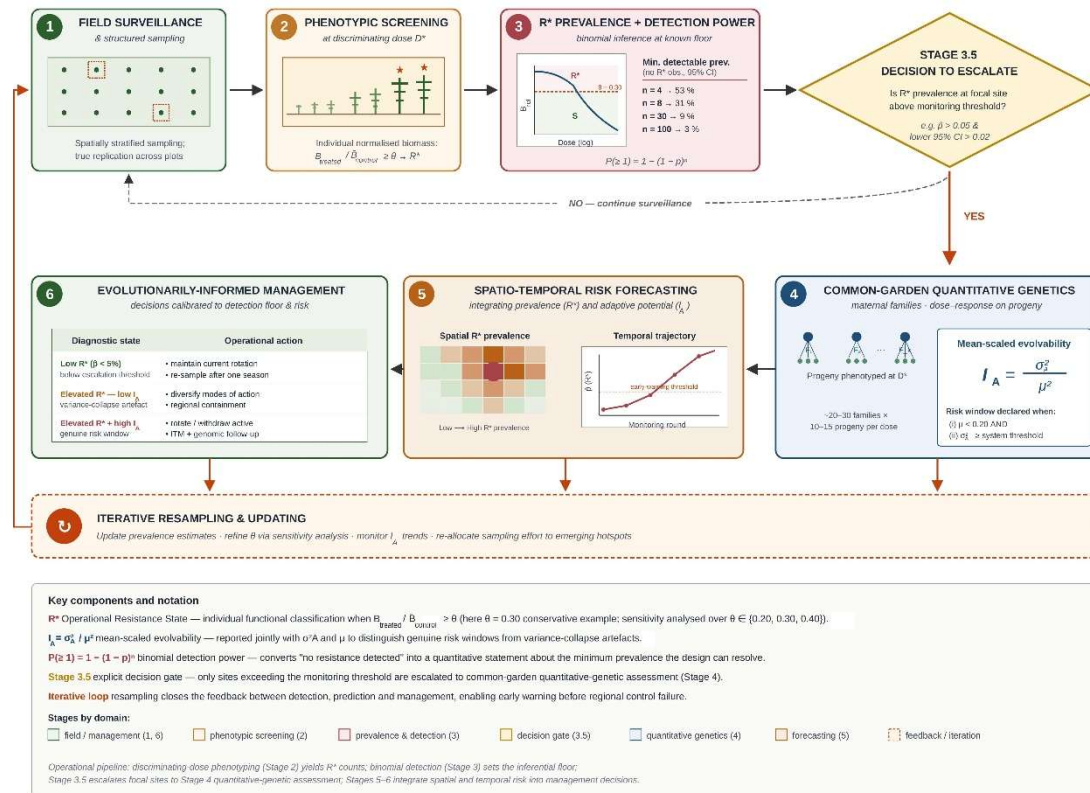
In this Perspective, we propose a shift in focus: from reactive diagnoses of established resistance to eco-evolutionary early-warning systems based on functional prevalence, detection power and adaptive potential. The aim is not to replace dose–response curves, molecular assays or mechanistic studies. The aim is to organise these tools into an operational sequence: first detect and quantify rare functional signals; then identify focal populations; then estimate genetic variance and evolvability where risk justifies it; and finally integrate the results into spatial management decisions. To ground this proposal empirically, we apply the framework to a worked dose–response example calibrated against published bioassay literature and outline how the same logic can be applied to existing monitoring datasets without requiring new field campaigns.

This Perspective responds to a question that is central to evolutionary applications: how can evolutionary knowledge be translated into management decisions before the problem becomes irreversible? For herbicide resistance, we structure that question around four objectives: (i) to define R^* as a functional resistance state based on a phenotypic threshold; (ii) to demonstrate how R^* prevalence and its binomial detection power complement classical measures such as GR_{50} ; (iii) to establish criteria for

interpreting evolutionary risk windows using trait mean, additive genetic variance and mean-scaled evolvability jointly; and (iv) to propose a monitoring workflow that connects phenotypic screening, structured sampling, quantitative-genetic assessment and regional management.

By framing the contribution in this way, we argue that herbicide resistance should cease to be treated only as the final consequence of selection and start to be treated as a measurable trajectory. Evolutionarily informed management does not eliminate evolution, but it improves the capacity to detect it early, interpret its scale and intervene before rare phenotypes become widespread control failures.

FIGURE 1. Operational flow of the eco-evolutionary framework to monitor herbicide resistance. Populations are sampled in the field, phenotypically screened under a discriminating dose and classified by Operational Resistance State (R^*); the prevalence of R^* is integrated with binomial detection power. When R^* prevalence at focal sites exceeds a monitoring threshold (Stage 3.5: decision to escalate), seed is collected from maternal plants at high-prevalence sites and grown in a common garden; dose–response bioassays on families allow estimation of additive genetic variance (σ_A^2) and mean-scaled evolvability ($I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$). Prevalence and evolvability are then integrated into spatial and temporal risk analyses, guiding management decisions and iterative resampling.



1. 2 Historical limitations: why the TSR paradigm is insufficient

The initial predominance of target-site resistance (TSR) reflected the first well-characterised cases of resistance, in which mutations in ALS, ACCase and EPSPS produced clear phenotypes that were easy to model.^{1,4,43} This reinforced the impression that resistance would generally be monogenic and predictable. However, even in the 1990s and 2000s, evidence had accumulated that many populations were exhibiting continuous responses to herbicide, variation between environments, and resistant phenotypes without detectable TSR mutations.^{44–46} These patterns indicated that a paradigm focused solely on TSR was insufficient to explain all the observed diversity.

Subsequently, it became evident that NTSR mechanisms — including detoxification by cytochromes P450 and glutathione S-transferases^{6,11–13,15,47} and transport/compartimentalisation processes¹⁴ — can confer multiple resistance and significant variability among individuals.^{7,11,14,15} Unlike specific TSR mutations, which may be associated with adaptive costs⁴⁸, NTSR often involves polygenic architecture and regulation, with a strong dependence on the environment. These characteristics are compatible with rapid response under intense selection.^{16,22,24}

Furthermore, agricultural populations are rarely panmictic and isolated.^{33,49} In connected landscapes, gene flow via seeds and pollen^{36,37}, amplified by the movement of agricultural machinery³⁴, can accelerate the spread of adaptive variants. Pollen disperses resistant alleles over long distances^{35,37}, and the resulting gene flow favours the persistence and regional expansion of resistance.^{33,38} In this context, focusing exclusively on TSR mutations describes only part of the process and tends to underestimate the role of NTSR and spatial connectivity in resistance dynamics.

1. 3 Spatial dynamics and the need for population tools

The central point is simple: resistance does not emerge in isolated plants, but in populations. Mechanisms belong to individuals, but adaptation is a population trait, since evolution acts on allele frequencies over time and space.^{36,49–51} In agricultural systems, fields, farms and regions function as partially connected evolutionary units^{4,16}, linked by natural pollen and seed dispersal^{35,37} as well as anthropogenic vectors such as agricultural machinery.^{33,34} Long-lived soil seedbanks further extend the temporal scale of these dynamics, providing a reservoir of genetic variation that can re-emerge after several seasons and that may amplify the persistence of incipient resistance even when current-season selection has eased.⁵²

This spatial heterogeneity creates distinct scenarios: areas of high selection pressure favour directional response; connected regions tend to share adaptive variants; low-density areas may be more influenced by drift; and recombination reorganises existing genetic combinations.^{4,16,37,38,40,49} These factors help to explain why NTSR can arise in multiple locations and why recurring regional patterns may be consistent with evolutionary rescue under intense selection.^{6,24,38}

To operationalise this perspective, it is essential to use tools that are compatible with the type of data collected. In phenotype-based monitoring, the natural target of inference is the prevalence of the resistant state and its change over time and space, using binomial, temporal and spatial models. When genotypic data are available (e.g. TSR mutations or molecular panels), population-genetic metrics can be applied to examine structure, connectivity and evolutionary history. In such a case, differentiation analyses (e.g. F_{ST}) and hierarchical approaches can be informative, provided they are interpreted in light of demography, parallel selection and sampling design.^{36,39,41,42,53}

1. 4 The Importance of Early Detection and Strategic Sampling

No evolutionary model is of practical use if it fails to detect resistance when it is still at low prevalence.^{4,9,16,54,55} Historically, many monitoring programmes have operated with small, poorly stratified samples and without an explicit basis for detection power, which can lead to late diagnoses.^{9,56} As a result, some of the cases interpreted as “abrupt emergence” may reflect sampling limitations that did not capture gradual changes in the resistant sub-population, a scenario consistent with the spatial dynamics of structured populations^{36,38} and limited detection power.⁹ Regional studies on *Lolium rigidum* show how connectivity via pollen-mediated gene flow

^{35,37} and agricultural logistics via seed dispersal^{33,34} can favour the spread of adaptive variants in the landscape. Meanwhile, evidence from population genomics reinforces that pre-existing variation can support rapid responses under intense selection.²⁴

The central difficulty is that rare events — whether at low allele frequency (when genotypes are available) or low prevalence of a functional state (when only phenotype is available) — are highly sensitive to sampling error. With small sample sizes, non-detection does not imply absence, and point estimates can fluctuate widely due to stochastic effects.^{9,57} In structured populations, hierarchical patterns of variance can only be inferred when the sample design adequately represents the spatial context.^{9,41,57} Furthermore, in field studies, the assumption of independence between sampling units is often violated by spatial aggregation; treating sub-samples within the same plot as independent replicates inflates apparent power and compromises inferences, making it necessary to distinguish between true replication and pseudo-replication.⁵⁸

It is therefore useful to explicitly distinguish between two monitoring objectives: conservative detection (early warning) and prevalence estimation (surveillance). In detection mode, classical models for detecting rare variants show that the probability of capturing at least one event with very low actual frequency requires large sample sizes.^{27,28} Although originally formulated in a genetic context, these models are statistically equivalent to the problem of detecting low prevalence of the R^* functional state, because both depend on the probability of observing at least one “success” in n attempts.²⁶ Thus, the operational question is no longer “is resistance present?” but rather “what is the detection limit of my sample design for a rare event?”^{26–28}

Low-rate selection regimes can additionally accelerate the evolution of resistance because sub-lethal doses both allow greater survival of phenotypes carrying minor-

effect alleles and may increase mutation rates,⁵⁹ further reinforcing the need for early-warning designs aligned with rare-event theory. This framework makes monitoring explicitly conservative for risk analysis. For example, under a simple binomial model, if no R^* individuals are observed in a sample of 100 plants, the conservative upper limit for the actual prevalence compatible with the data, at 95% confidence, is approximately 3%.^{26,27} In practical terms, this does not state that the prevalence in the field is 3%; it states that, with this n , it is possible for prevalence to be at this level and for monitoring to fail due to sampling stochasticity, illustrating the “worst plausible scenario” logic used in risk management.²⁸

In surveillance mode, when R^* is observed ($x > 0$), prevalence should be treated as an estimate with uncertainty and interpreted in time and space, rather than as a fixed value. This implies prioritising repeated and stratified sampling, with true replication between plots/points, so that comparisons between crops and areas reflect trends rather than sampling noise.^{9,58,60} Following this logic, the functional prevalence of R^* provides an operational early-warning indicator that can be mapped and monitored over repeated rounds. Meanwhile, genetic tools can be integrated when genotypic data are available to investigate connectivity and evolutionary history, without extrapolating inferences beyond the type of data collected.^{9,24}

In summary, the historical limitations of monitoring lie not only in the absence of techniques, but in the lack of sampling designs aligned with evolutionary theory and rare-event statistics. When the design specifies the detection limit²⁸, incorporates spatial stratification and temporal repetition^{33,38,60} and avoids pseudo-replication⁵⁸, monitoring ceases to be reactive and begins to offer quantitative information for risk management before resistance reaches operationally critical levels.^{6,9}

1. 4.1 Worked sampling/detection example: early warning sensitivity for low R* prevalence

If the actual prevalence of individuals in R* is p (e.g., 3%), what sample size n is required to detect at least one R* with a probability of $1 - \beta$ (i.e., 95%)?

Assuming random sampling and independence, the probability of observing no R* is $(1 - p)^n$. Therefore, the probability of detecting at least one R* is:

$$P(\geq 1) = 1 - (1 - p)^n$$

If we set a desired detection level of $1 - \beta$, we get:

$$1 - (1 - p)^n \geq 1 - \beta$$

$$(1 - p)^n \leq \beta$$

$$n \geq \frac{\ln(\beta)}{\ln(1 - p)}$$

For $p = 0.03$ and a target of 95% chance of detection ($\beta = 0.05$):

$$n \geq \frac{\ln(0.05)}{\ln(0.97)} \approx \frac{-2.996}{-0.03046} \approx 98.4$$

Thus, $n = 99$ individuals already offers an approximately 95% chance of observing at least one R* if the actual prevalence is 3%. For a 90% chance ($\beta = 0.10$), $n \approx 76$. For 99% ($\beta = 0.01$), $n \approx 151$.

This calculation shows why small sample sizes (e.g., 20 to 30 plants) have low detection power when functional resistance is rare: where $n = 30$ and $p = 0.03$,

$$P(\geq 1) = 1 - (0.97)^{30} \approx 0.60$$

Or, there is a 40% chance of failure even when resistance is present at 3%.

It is important to note that detecting a single R^* individual at 3% prevalence does not equate to proactive prevention. A population at 3% R^* prevalence is already approximately one to two generations of recurrent selection from operational failure.^{16,55,61} The value of this framework lies in structuring monitoring designs that can detect resistance earlier than GR_{50} -shift-based surveillance — not in claiming that 3% detection prevents resistance. The framework converts the qualitative statement “resistance not detected” into a quantitative statement of the form “resistance not detected at a frequency above MDP%, given n and a chosen β ”.

For surveillance, the question is not “is R^* occurring somewhere?”, but “where is R^* occurring and how fast is it growing?” A simple design is to stratify by plots/points (clusters) and repeat over time. If we collect n_j individuals per point j , we estimate the local prevalence $\hat{p}_j = \frac{x_j}{n_j}$ and monitor $\hat{p}_j(t)$ over successive monitoring rounds. This allows us to: (i) map hotspots; and (ii) detect minor increases before average-based summaries (e.g., GR_{50}) change in a detectable way; and generate true replication between plots rather than within them.⁵⁸ In practice, this prioritizes individual samples that are replicated spatially (e.g., 8 to 10 points, with 20 to 30 samples each) rather than a single, mixed sample without georeferencing, because the goal is not to assess presence or absence.

1. 5 Operational Resistance State (R^*): a unifying operational unit

To date, the greatest barrier to integrating NTSR into population-based approaches has been operational: metabolic and physiological responses tend to produce continuous distributions that are sensitive to the environment and difficult to map as a “single genotype”.⁶ However, selection does not act on isolated genes, but on the integrated phenotype.^{17,18} This leads us to the Operational State of Resistance (R^*) proposed here to translate the continuum of plant performance under herbicide application into a comparable phenotypic population variable.

The novelty of R^* is not the act of applying a threshold to a continuous response — that has been done for decades under the labels “discriminating dose”, “operational threshold” or “survival cut-off”.^{9,10,25} The novelty is the integration: R^* explicitly couples (i) threshold-based phenotyping, (ii) binomial detection power, (iii) additive variance and mean-scaled evolvability, and (iv) spatial-population logic into one operational pipeline. Each of these components exists in the weed-science and quantitative-genetic literatures separately; the contribution of this Perspective is to formalise the bridge between them, so that the same accession that yields an HRAC three-class score^{25,29–31} can also yield a minimum detectable prevalence, a forecast of evolutionary response, and a spatially explicit risk map.

R^* is neither a gene, a mutation nor a molecular marker. It is an operational abstraction that asks: does an individual achieve sufficient performance to survive under a target dose? It is a binary classification applied to a continuous phenomenon.¹⁷ The threshold can be calibrated empirically using metrics such as relative biomass, standardised survival or differential responses to metabolic inhibitors.^{8,11,14,15} Individuals above the threshold are classified as R^* ; those below are classified as susceptible (S).

As a conservative operational example, we define R^* using individually measured, normalised above-ground dry biomass, with $\theta = 0.30$ representing 30% biomass retention relative to the untreated control. The choice of θ is consequential and should be made transparently. The European protocol of Panozzo *et al.*²⁵ combines survival counts, visually estimated biomass and, in some implementations, weighed biomass as operational screening endpoints, with permissive thresholds (e.g. $\theta \approx 0.20$) calibrated for *Lolium*, *Avena* and *Alopecurus*; Moss *et al.*⁶² followed a comparable logic for *Alopecurus myosuroides* in the United Kingdom. These protocols establish the tradition of threshold-based functional classification in resistance diagnostics. The present framework follows the same logic of threshold-based classification, but adopts as its preferred endpoint individually measured, normalised above-ground dry biomass — a continuous, individual-level quantitative variable — rather than visually estimated or operationally scored biomass. The present example adopts $\theta = 0.30$ as a conservative reference; $\theta = 0.20$ is a stringency comparable to the permissive operational range used in screening protocols, and $\theta = 0.40$ illustrates a more restrictive choice. The choice of θ directly determines the prevalence estimate and should be calibrated empirically or aligned with established operational criteria for the species and management context.^{9,25,62} A formal sensitivity analysis comparing prevalence estimates under $\theta = 0.20$, 0.30 and 0.40 for the same underlying population is presented in session 5.2 (Table 2) and should be reported for any new application of R^* .

The binary phenotypic classification (R^*/S) used in the models can be determined based on normalized aboveground dry biomass, according to the following criterion:

$$R^* \text{ if } \frac{B_{\text{Treated}}}{\bar{B}_{\text{Control}}} \geq 0.30$$

$$S \text{ if } \frac{B_{\text{Treated}}}{\bar{B}_{\text{Control}}} < 0.30$$

where B_{Treated} is the aboveground dry biomass of the treated population, and $\bar{B}_{\text{Control}}$ is the mean aboveground dry biomass of the untreated control population.

Equivalently, the functional threshold can be expressed as:

$$\tau = \theta * \bar{B}_{\text{Control}}$$

where θ represents a conservative functional threshold ($\theta = 0.30$), corresponding to a 70% reduction in biomass relative to the untreated control.

The strength of R^* is that it captures the integrated phenotype, which may reflect the combined contributions of detoxification (P450, GST, UGT), transport/efflux (including ABC transporters), compartmentalisation and vacuolar sequestration^{7,63,64}— without requiring molecular resolution of the underlying loci. What R^* isolates is the variable that selection “sees”: functional survival under herbicide selection. By reframing resistance as a threshold state, R^* enables inferences at the population level: estimating prevalence and sampling uncertainty; comparing locations and crops; modelling temporal changes; mapping spatial patterns; and prioritising samples for downstream mechanistic characterisation. Thus, R^* does not replace molecular biology; it organises surveillance and connects mechanisms at the population level where evolution is manifest (Table 1).

1. 5. 1 Dose–response worked example: small change in the average vs. increase in the upper tail captured by prevalence of R^* .

Average-based metrics (e.g., GR_{50} , relative average biomass) may change little while the fraction of functional survivors in the upper tail grows measurably. That fraction is precisely what R^* captures as prevalence above a threshold.

With a fixed dose D^* (the surveillance dose), we define R^* by relative biomass:

$$R^* \text{ if } \frac{B_{\text{Treated}}}{\bar{B}_{\text{Control}}} \geq 0.30$$

Where $\theta = 0.30$, as an operational threshold (conservative example).

We considered two samples t_0 and t_1 (over time), with the same bioassay and the same dose D^* .

- For t_0 : the average relative biomass under D^* is $\mu_0 = 0.18$, and we observed $x_0 = 3$ R^* individuals at $n_0 = 100$, therefore $\hat{p}_0 = 3\%$.
- For t_1 : the average changes slightly to $\mu_1 = 0.20$ (a small change that is potentially difficult to interpret), but we now observe $x_1 = 10$ at $n_1 = 100$, therefore $\hat{p}_1 = 10\%$.

With this, we can see that the average has changed only slightly, but what matters for future operational failure is the presence of individuals capable of maintaining performance above θ when subjected to D^* . The prevalence of R^* increased from 3% to 10%, an early warning sign. This change is measurable and actionable for management, as it represents the expansion of a functionally resistant subpopulation, even when the shift in the summary average is still modest.

In terms of the dose-response curve, it is possible that in the overall adjustment of a log-logistic model that summarizes $GR_{50}^{8,68,69}$, there is a small shift between t_0 and t_1 . This occurs especially when the frequency of resistant individuals remains low, given that: (i) resistant individuals may be rare in suspect populations⁸; (ii) natural variation may result in R^*/S close to 10 without actual

resistance⁵; and (ii) farmers generally only detect problems when approximately 35% of the population is resistant⁵.

Nevertheless, there is an increase in variance in the upper tail, i.e., more individuals maintaining biomass relatively above the threshold at D^* , producing a clear increase in $\hat{p}(R^*)$. In other words, R^* is sensitive to changes in distribution, not just in the center.

The same example extends to maps and repeated rounds. If at t_0 most points have $\hat{p} \approx 8 - 15\%$, the system detects (i) hotspots and (ii) trajectories, supporting targeted intervention before resistance translates into large changes in GR_{50} or widespread control failure.

1. 5. 2 Sensitivity analysis: how the choice of θ alters inference.

Because θ is operationally consequential, applying R^* without reporting a sensitivity analysis over plausible alternatives may obscure the very early-warning signal the framework is designed to expose. Table 2 illustrates how the same population from session 5.1 (t1 data) yields three different prevalence estimates under three commonly used thresholds.

Table 1 - Sensitivity of R^* prevalence to the choice of threshold θ for the same hypothetical population at t1 ($n = 100$; dose D^*). Confidence intervals are 95% exact binomial.²⁶

θ	Survivor criterion	R^* prevalence (95% CI)	Source / context
0.20	$\geq 20\%$ measured biomass retained	16% (9.4 – 24.7%)	Stringency comparable to permissive operational thresholds used in screening protocols (e.g. Panozzo <i>et al.</i> 2015 ²⁵), here applied to individually measured normalised biomass
0.30	$\geq 30\%$ measured biomass retained	10% (4.9 – 17.6%)	Present conservative example (individually measured normalised biomass)
0.40	$\geq 40\%$ measured biomass retained	6% (2.2 – 12.6%)	More restrictive screening (individually measured normalised biomass)

A permissive criterion ($\theta = 0.20$) doubles the apparent prevalence relative to a restrictive criterion ($\theta = 0.40$), but neither value is “right” or “wrong” per se: each operationalises a different definition of “functional survival under selection”. The implication is methodological, not numerical. We recommend that any application of R^* (i) specify θ a priori, (ii) justify the choice with reference to species-specific bioassay calibration or established protocols^{9,25,62}, and (iii) report the sensitivity table for at least three values of θ spanning the plausible range.

Table 2 - Comparison between genomic population approaches and the proposed Operational Resistance State (R^*) framework.

Criterion / Feature	Genomic Population Approach (e.g., GBS, Target-Site Sequencing)	Proposed Operational Framework (R^*) (Phenotypic Screening & Evolvability)
Primary Data Unit	DNA polymorphisms (SNPs, CNVs) and allele frequencies at specific loci, enabling direct estimation of population differentiation (F_{ST}) and marker-based analyses of selection and structure ^{36,39,49,65} .	Functional survival status under a standardized discriminatory dose, treated as a threshold derived from an underlying liability distribution ^{17,65} . Sampling precision and detection limits follow classical rare-event theory, where required N increases sharply as frequency decreases ²⁸ .
Mechanistic Resolution	High mechanistic resolution: identifies specific TSR mutations ^{6,43} , genomic regions under selection ^{63,64} , and linkage disequilibrium patterns associated with resistance or fitness costs. ⁶⁴	Integrative resolution: captures the net phenotypic outcome of all contributing mechanisms (TSR + NTSR + $G \times E$), without resolving individual loci. Conceptually aligned with phenotypic differentiation approaches (P_{ST}/Q_{ST} logic) when molecular resolution is unavailable. ^{40,66}
Population Metrics	Marker-based differentiation metrics such as F_{ST} and related estimators ^{36,39} , plus genome-scan approaches to detect loci under selection. ⁶⁵	Phenotypic differentiation (P_{ST}) as an analogue of Q_{ST} when additive variance underlies the trait; interpreted cautiously given environmental components and assumptions. ^{40,66,67}

Inference Scope	Mechanistically informative, suitable for both reconstructive and forward-looking inference when complemented with demographic models: identifies historical migration, divergence and selection signatures across the genome. ^{39,65} F_{ST} captures differentiation but does not by itself prove adaptive divergence or multiple origins. ^{42,48}	Short-term adaptive inference: tracks changes in functional-state prevalence across time and space. When framed within Q_{ST} – F_{ST} theory, can suggest divergent selection if $P_{ST} > F_{ST}$, but only under explicit assumptions and without mechanistic claims ^{40,66} .
Scalability & Cost	High data complexity and analytical burden; genome-wide marker studies require bioinformatics pipelines and careful filtering to avoid false positives. ⁶⁵	High-throughput phenotypic screening is logistically scalable; however, detection of low-frequency resistance still requires adequate sample sizes governed by binomial probability and rare-allele capture theory. ²⁸
Management Utility	Essential for understanding evolutionary origin, parallelism, linkage disequilibrium, and validating causal mutations. ^{49,64}	Operationally focused: provides rapid estimation of functional resistance prevalence and adaptive potential (I_A = evolvability), enabling spatial risk mapping and early-warning surveillance prior to full mechanistic resolution. ^{28,66}

Genomic methods infer population structure and selection using allele frequencies and marker-based metrics (e.g., F_{ST}), providing high mechanistic resolution and retrospective evolutionary insight. The R^* framework relies on standardized phenotypic

screening under a discriminatory dose, treating resistance as a functional threshold state to estimate prevalence, detection limits, and short-term adaptive potential when additive variance can be assessed. The two approaches are complementary: genomic analyses resolve mechanism and evolutionary origin, whereas R^* enables scalable early-warning surveillance and operational risk assessment.

A key consequence of defining R^* on individually measured, normalised biomass — rather than on a purely visual or operationally scored endpoint — is that the binary R^*/S classification can be interpreted as a threshold trait in the formal sense of quantitative genetics.¹⁷ Under this view, the observed binary state is the discrete manifestation of an underlying continuous liability distribution determined by genetic and environmental variation;^{17,18} individuals whose liability exceeds θ are scored as R^* . This framing matters operationally because, when phenotyping is conducted on measured biomass at the individual level (preferably through maternal-family or progeny structures), the resulting data preserve the underlying quantitative variation in the population and allow estimation of state prevalence, threshold sensitivity, and — when family structure is available — additive genetic variance and mean-scaled evolvability. It is this quantitative formulation, not the act of applying a threshold per se, that bridges threshold-based functional screening with the genetic forecasting tools developed in the next section.

1. 6 Evolvability (I_A): kinetic metrics for prediction

Once the population diagnosis via R^* has been established, the next step in a predictive framework is to quantify the potential for evolutionary response under selection. In classical quantitative genetics, the response per generation depends on strict sense heritability (h^2) and the selection differential¹⁷. However, for weeds under herbicide stress this approach may have limited utility as a predictive metric because phenotypic variance (σ_P^2) is often amplified by environmental noise, dominance, epistasis, and genotype $\times$ environment interactions¹⁷. Since $h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$, an increase in σ_P^2 will reduce h^2 , even when σ_A^2 remains high, leading to underestimations of evolutionary potential¹⁹. This point was formalized by Hansen, Pélabon, and Houle²⁰, who argued that heritability is not a direct metric of evolvability. Empirical evidence in weed systems supports this concern: in *Alopecurus myosuroides*, metabolic resistance traits show polygenic architecture and substantial standing variation that classical heritability metrics under-represent.⁷⁰

To circumvent this limitation, we adopted medium-scale evolvability, defined as $I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$ (Hansen *et al.*²⁰). Unlike h^2 , which is a proportion strongly dependent on σ_P^2 , I_A expresses the additive variance in units relative to the squared phenotypic mean, favouring comparisons between populations and conditions. Numerically, I_A has a direct interpretation as the expected proportional change in the trait mean per unit of mean-scaled selection, consistent with the classical formalism of multivariate evolutionary response under quantitative-genetic selection.⁷¹

Since I_A is dependent on μ^2 it can increase mechanically when the mean (μ^2) decreases at higher doses, even if σ_A^2 does not change. This produces an inferential

trap: a population where the dose has driven μ close to zero will exhibit a large IA regardless of whether any heritable variation persists. The interpretive value of IA therefore depends not on its magnitude alone but on the joint behaviour of σ^2_A and μ . We return to this point with explicit diagnostic criteria in session 6.1.

1. 6. 1 Defining a risk window: explicit diagnostic criteria

We define a risk window operationally as the simultaneous occurrence of the following two conditions:

Condition (i): Substantial mean suppression under the tested dose — $\mu < 0.20$ (relative biomass), indicating that the dose is effectively filtering the susceptible portion of the population.

Condition (ii): Persistence of non-trivial additive genetic variance — σ^2_A greater than a system-specific lower threshold (defined empirically per species, ideally $\geq$ the 25th-percentile σ^2_A value observed across a reference panel of populations of the same species), indicating that heritable variation remains in the population despite mean suppression.

IA alone is insufficient to diagnose a risk window. Researchers should report σ^2_A and I_A jointly at each dose evaluated, so that readers can distinguish between high IA values reflecting genuine heritable variation and high I_A values reflecting mean collapse alone. The two contrasting scenarios below illustrate this requirement.

Scenario A (genuine risk window). $\sigma^2_A = 0.0025$; μ declines from 0.20 (moderate dose) to 0.10 (high dose). Then IA quadruples from 0.0625 to 0.25. Because σ^2_A persists at a biologically meaningful level, the inflated I_A reflects real evolutionary

potential. The population is at risk: selection on the upper tail can rapidly increase R^* prevalence.

Scenario B (artefact). At a higher dose, μ collapses from 0.20 to 0.05, while σ_A^2 declines from 0.0025 to 0.0005. I_A rises mechanically from 0.0625 to 0.20, despite an 80% reduction in additive genetic variance. This is not a genuine risk window, because the apparent increase in I_A is driven mainly by mean collapse: with σ_A^2 largely depleted, little heritable variation remains for selection to act upon.

The operational rule is simple: a risk window is declared only if (i) $\mu < 0.20$ AND (ii) σ_A^2 exceeds the species-specific lower threshold. Failing either criterion, the dose tested does not yield diagnostic information for short-term forecasting.

1. 6. 2 Choice of trait and the bounded-trait problem

The trait z used for evolvability estimation should be relative above-ground biomass ($B_{\text{treatment}}/\bar{B}_{\text{control}}$), evaluated at each dose in a common-garden design. This standardisation removes between-environment variation in absolute biomass while preserving the dose-specific performance gradient. Relative biomass is, however, a bounded trait on $[0, 1]$, which can introduce bias into standard additive-variance estimation when the distribution is highly skewed — particularly when a substantial fraction of plants scores at or near zero under complete suppression. In such cases, we recommend applying a logit or arcsine-square-root transformation to z prior to estimating σ_A^2 , to stabilise the variance before fitting quantitative-genetic models.⁷² Untransformed means should be reported alongside transformed-scale variance estimates to preserve biological interpretability.

When most plants fall away from the bounds (e.g. $0.10 < z < 0.90$ for most observations), transformations may be unnecessary and untransformed σ_A^2 can be reported directly. The transformation decision should be made on inspection of the empirical distribution of z at each dose, not by default.

1. 6. 3 Practical estimation of σ_A^2 across mating systems

In practice, estimation of σ_A^2 requires a pedigreed design conducted in a common environment. The most logistically tractable design depends on the mating system of the species.¹⁷

For predominantly outcrossing species (e.g. *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides*), open-pollinated maternal families are the most tractable option: seed is collected from individual maternal plants in the field, families are grown in a common garden and the herbicide bioassay is conducted on the resulting families. Under the half-sib approximation, $\sigma_A^2 \approx 4 \times \sigma^2$ among-families, with the caveat that maternal effects (shared seed provisioning, cytoplasmic effects) can upwardly bias variance estimates.¹⁷ To minimise this bias, the recommended protocol is: (i) standardise seed mass before sowing; (ii) randomise trays/positions within the glasshouse; and (iii) propagate families for at least one generation in a common environment before phenotyping. A minimum sample size of approximately 20–30 families $\times$ 10–15 individuals per family per dose (totalling $\sim$ 500–1,500 plants per population) is feasible within a single glasshouse trial.

For predominantly selfing species (e.g. *Avena fatua*, *Echinochloa crus-galli*), full-sib or inbred-line designs are preferable, because maternal families will be nearly isogenic and σ_A^2 cannot be reliably estimated from among-family variance alone. In

inbred-line designs, the among-line variance approximates twice the additive genetic variance, $\sigma_A^2 \approx \frac{1}{2} \times \sigma^2$ among-lines (under the assumption of complete inbreeding).

These designs are resource-intensive relative to single-dose discriminating screening. For this reason, the workflow proposed here applies evolvability assessment only to focal populations identified by the R^* prevalence screening (Stage 3.5 in Figure 1) — not routinely to every population in a regional survey. The decision rule is: if R^* prevalence at a site exceeds an a priori monitoring threshold (e.g. $p > 0.05$ with a lower 95% CI bound above 0.02), the site is escalated to the common-garden quantitative-genetic phase; otherwise, surveillance continues with phenotypic monitoring alone.

1. 6. 4 Integration of R^* and I_A .

Integrating R^* (current functional state, measured as prevalence above θ) with I_A (proportional response potential) allows three pieces of information to be separated which, in practice, become confused when only mean summaries are considered: (i) the current prevalence of R^* ; (ii) the amount of adaptive potential in the trait at the dose considered; and (iii) the conditions/doses under which this potential tends to be greatest. When σ_A^2 can be estimated, I_A provides the quantitative bridge between diagnosis and prediction. Instead of asking only “is there R^* ?”, we can ask “what is the proportional capacity for R^* prevalence to increase under selection, and where is this increase likely to be fastest?”

1. 7 Conclusion: Towards Evolutionarily Intelligent Management

Herbicide resistance is not an accident, nor is it a collection of scattered mutations. Rather, it is the predictable manifestation of natural selection acting on populations exposed to intense and repeated pressures. In connected agricultural systems, where seeds, pollen, and management practices create dynamic networks of gene flow and evolutionary opportunity, adaptation ceases to be the exception and becomes a recurring outcome.

In recent decades, scientists have sought answers in molecular biology and the TSR/NTSR division and significantly progressed the identification of mechanisms. However, population considerations have remained in the background, leading to late diagnoses and predominantly reactive management. Evidence now suggests that it is no longer enough to understand the mechanism if we do not understand how resistance emerges, persists, and spreads across time and space.

The conceptual model proposed herein reorganizes this scenario by integrating metabolic physiology, quantitative genetics, and population theory into a single eco-evolutionary framework. The Operational State of Resistance (R^*) translates a continuum of plant performance when exposed to herbicide application into a functional threshold state. This enables us to compare populations and track changes, such as prevalence, with quantifiable uncertainty, without confusing phenotype with allele frequency. When genotypic data are available, formal population genetics tools can be integrated to investigate structure and connectivity; however, they must be applied at the appropriate genetic level, with interpretations conditioned by demography, parallel selection, and sampling design.

Similarly, medium-scale evolvability provides a complementary module to qualify the proportional response potential under specific doses when σ_A^2 can be estimated, but

its interpretation requires caution, as $I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$ can mechanically inflate when μ decreases. Nevertheless, the predictive value emerges when σ_A^2 persists and selection acts consistently on the upper tail of the distribution. In this framework, R^* describes the current state (functional prevalence), while e qualifies the potential for response under selection, without implying dependence between the metrics.

The explicit incorporation of sampling criteria for rare events makes early detection less dependent on luck and more on statistical power and detection limits, recognizing that absence of detection is not evidence of absence when prevalence is low. By combining an operational endpoint (R^*), a sampling design geared towards rare events, and spatial/temporal monitoring, management can shift from a late diagnosis of control failure to risk-oriented quantitative surveillance that can anticipate trends and prioritize interventions.

A truly predictive model does not eliminate evolution. But it can improve our ability to monitor the system in real time and align management decisions with the eco-evolutionary dynamics that govern resistance. Herbicide resistance will continue to emerge; however, with a framework that clearly separates functional status, response potential, and detection limits, management no longer pursues the problem and instead operates based on evolutionary intelligence and comparable surveillance across crops and regions.

REFERENCES

1. Powles SB, Yu Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:317–47.
2. Heap I. The International Survey of Herbicide-Resistant Weeds [Internet]. [cited 2025 Dec 22]. Available from: <http://www.weedscience.org>
3. Beckie HJ, Harker KN. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. *Pest Manag Sci.* 2017;73(6):1045–52.
4. Jasieniuk M, Brûlé-Babel AL, Morrison IN. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Sci.* 1996;44:176–93.
5. Tranel PJ, Wright TR. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* 2002;50:700–12.
6. Délye C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manag Sci.* 2013;69(2):176–87.
7. Yu Q, Powles S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiol.* 2014;166(3):1106–18.
8. Seefeldt SS, Jensen JE, Fuerst EP. Log-logistic analysis of herbicide dose–response relationships. *Weed Technol.* 1995;9(2):218–27.
9. Burgos NR, Tranel PJ, Streibig JC, Davis VM, Shaner D, Norsworthy JK, *et al.* Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Sci.* 2013;61:4–20.
10. Beckie HJ, Heap IM, Smeda RJ, Hall LM. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technol.* 2000;14(2):428–45.
11. Siminszky B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem Rev.* 2006;5:445–58.
12. Cummins I, Dixon DP, Freitag-Pohl S, Skipsey M, Edwards R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab Rev.* 2011;43(2):266–80.
13. Iwakami S, Kamidate Y, Yamaguchi T, Ishizaka M, Endo M, Suda H, *et al.* CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytol.* 2019;221:2112–22.
14. Sammons RD, Gaines TA. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci.* 2014;70(9):1367–77.

15. Cummins I, Wortley DJ, Sabbadin F, He Z, Coxon CR, Straker HE, *et al.* Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):5812–7.
16. Neve P, Vila-Aiub M, Roux F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytol.* 2009;184:783–93.
17. Falconer DS, Mackay TFC. *Introduction to Quantitative Genetics.* 4th ed. Harlow: Longman; 1996.
18. Fisher RA. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans R Soc Edinb.* 1918;52:399–433.
19. Houle D. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics.* 1992;130:195–204.
20. Hansen TF, Pélabon C, Houle D. Heritability is not evolvability. *Evol Biol.* 2011;38:258–77.
21. Neve P, Powles S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theor Appl Genet.* 2005;110:1154–66.
22. Busi R, Neve P, Powles S. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evol Appl.* 2013;6(2):231–42.
23. Busi R, Powles SB. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity.* 2009;103:318–25.
24. Kreiner JM, Stinchcombe JR, Wright SI. Population genomics of herbicide resistance: adaptation via evolutionary rescue. *Annu Rev Plant Biol.* 2018;69:611–35.
25. Panozzo S, Scarabel L, Collavo A, Sattin M. Protocols for robust herbicide resistance testing in different weed species. *J Vis Exp.* 2015;(101):e52923. doi:10.3791/52923.
26. Ross SM. *A First Course in Probability.* 8th ed. Upper Saddle River (NJ): Pearson Prentice Hall; 2010.
27. Vencovsky R, Nass LL, Cordeiro CMT, Ferreira MAJ. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: *Recursos Genéticos Vegetais.* Brasília: EMBRAPA — Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2007.
28. Crossa J, Vencovsky R. Basic sampling strategies: theory and practice. In: Guarino L, Ramanatha Rao V, Goldberg E, editors. *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines — 2011 Update.* Rome: Bioversity International; 2011. p. 1–28.
29. Martins HL, Bacha AL, Martins JVF, Alves PLCA. Mapeamento da resistência de capim-amargoso a herbicidas no estado da Bahia. *Informe Técnico HRAC-BR.* 2024;5(2):1–15.

30. Oliveira RS Jr, Witter APW, Ferreira LAI, Granzioli L, Barion JH, Pasqualoto SP, *et al.* Monitoramento de resistência em biótipos de *Digitaria insularis* e *Eleusine indica* no Brasil. Informe Técnico HRAC-BR. 2025;6(1):1–16.
31. Markus C, Merotto A Jr, Kroth WAE, Kroth LVE, Sulzbach E, Bolzan RJB. Avaliação da ocorrência e distribuição de populações de capim-arroz escapes aos herbicidas no estado do Rio Grande do Sul. Informe Técnico HRAC-BR. 2024;5(3):1–22.
32. Kruuk LEB. Estimating genetic parameters in natural populations using the “animal model”. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359:873–90.
33. Beckie HJ, Busi R, Bagavathiannan MV, Martin SL. Herbicide resistance gene flow in weeds: under-estimated and under-appreciated. *Agric Ecosyst Environ.* 2019;283:106566.
34. Blanco-Moreno JM, Chamorro L, Masalles RM, Recasens J, Sans FX. Spatial distribution of *Lolium rigidum* seedlings following seed dispersal by combine harvesters. *Weed Res.* 2004;44(5):375–87.
35. Loureiro I, Escorial MC, Chueca MC. Pollen-mediated movement of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157892.
36. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugenics.* 1949;15(1):323–54.
37. Busi R, Yu Q, Barrett-Lennard R, Powles S. Long-distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theor Appl Genet.* 2008;117:1281–90.
38. Kreiner JM, Giacomini DA, Bemm F, Waithaka B, Regalado J, Lanz C, *et al.* Multiple modes of convergent adaptation in the spread of glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(42):21076–84.
39. Meirmans PG, Hedrick PW. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Mol Ecol Resour.* 2011;11:5–18.
40. Whitlock MC. Evolutionary inference from QST. *Mol Ecol.* 2008;17:1885–96.
41. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992;131:479–91.
42. Jost L, Archer F, Flanagan S, Gaggiotti O, Hoban S, Latch E. Differentiation measures for conservation genetics. *Evol Appl.* 2018;11:1139–48.
43. Gaines TA, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, *et al.* Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(3):1029–34.
44. Burnet MWM, Loveys BR, Holtum JAM, Powles SB. Increased detoxification is a mechanism of simazine resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic Biochem Physiol.* 1993;46:207–18.

45. Preston C, Tardif FJ, Christopher JT, Powles SB. Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pestic Biochem Physiol.* 1996;54(2):123–34.
46. Neve P, Powles S. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity.* 2005;95:485–92.
47. Yuan JS, Tranel PJ, Stewart CN Jr. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* 2007;12(1):6–13.
48. Vila-Aiub MM, Neve P, Powles SB. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytol.* 2009;184:751–67.
49. Hartl DL, Clark AG. *Principles of Population Genetics*. 4th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2007.
50. Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics.* 1931;16:97–159.
51. Lewontin RC. The units of selection. *Annu Rev Ecol Syst.* 1970;1:1–8.
52. Hartway CR, Ott JP, Grulke NE. Plant life span and persistence of soil seedbanks predict the emergence of herbicide resistance in noxious weeds. *Weed Sci.* 2022;70:448–54.
53. Hedrick PW. *Genetics of Populations*. 2nd ed. Sudbury (MA): Jones and Bartlett; 2000.
54. Gressel J. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Manag Sci.* 2009;65:1164–73.
55. Renton M, Busi R, Neve P, Thornby D, Vila-Aiub M. Herbicide resistance modelling: past, present and future. *Pest Manag Sci.* 2014;70:1394–404.
56. Comont D, Lowe C, Hull R, Crook L, Hicks HL, Onkokesung N, *et al.* Evolution of generalist resistance to herbicide mixtures reveals a trade-off in resistance management. *Nat Commun.* 2020;11:3086.
57. Crossa J, Vencovsky R. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. *Theor Appl Genet.* 1994;89:936–42.
58. Hurlbert SH. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol Monogr.* 1984;54(2):187–211.
59. Gressel J. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Manag Sci.* 2011;67:253–7.
60. Waples RS. Temporal variation in allele frequencies: testing the right hypothesis. *Evolution.* 1989;43(6):1236–51.
61. Neve P. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. *Weed Res.* 2007;47(5):365–9.

62. Moss SR, Perryman SAM, Tatnell LV. Managing herbicide-resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides*): theory and practice. *Weed Technol.* 2007;21(2):300–9.
63. Cai L, Comont D, MacGregor D, Lowe C, Beffa R, Neve P, *et al.* The blackgrass genome reveals patterns of non-parallel evolution of polygenic herbicide resistance. *New Phytol.* 2023;237:1891–907.
64. Gupta S, Harkess A, Soble A, Van Etten M, Leebens-Mack J, Baucom RS. Interchromosomal linkage disequilibrium and linked fitness cost loci associated with selection for herbicide resistance. *New Phytol.* 2023;238:1263–77.
65. Narum SR, Hess JE. Comparison of F_{ST} outlier tests for SNP loci under selection. *Mol Ecol Resour.* 2011;11(Suppl 1):184–94.
66. Brommer JE. Whither PST? The approximation of QST by PST in evolutionary and conservation biology. *J Evol Biol.* 2011;24(6):1160–8.
67. Saether SA, Fiske P, Kalas JA, Kuresoo A, Luigujoe L, Piernney SB, *et al.* Inferring local adaptation from Q_{ST} – F_{ST} comparisons: neutral genetic and quantitative trait variation in European populations of great snipe. *J Evol Biol.* 2007;20(4):1563–76.
68. Streibig JC. Herbicide bioassay. *Weed Res.* 1988;28:479–84.
69. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose–response analysis using R. *PLoS One.* 2015;10(12):e0146021.
70. Comont D, MacGregor DR, Crook L, Hull R, Nguyen L, Freckleton RP, *et al.* Dissecting weed adaptation: fitness and trait correlations in herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides*. *Pest Manag Sci.* 2022;78(8):3039–50.
71. Lande R. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain:body size allometry. *Evolution.* 1979;33(1):402–16.
72. Warton DI, Hui FKC. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology.* 2011;92(1):3–10.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO: IMPACTO DO MÉTODO DE AMOSTRAGEM (*BULK* VS. PROGÊNIES) EM *Eleusine indica* (L.) Gaertn.

2. 1 INTRODUÇÃO

A resistência a herbicidas, embora historicamente tratada como uma anomalia ou como consequência do uso contínuo de um ingrediente ativo, representa um processo evolutivo observado em ecossistemas modificados pelo homem (Jasieniuk *et al.*, 1996). Cinco décadas de registros globais, consolidados por Heap (acessado em 27/01/2026) e discutidos no contexto agrícola por Beckie e Harker (2017), indicam que a resistência não é um acidente, mas uma resposta evolutiva à seleção imposta pelo manejo.

Nesse contexto, a detecção de plantas resistentes selecionadas pela ação do herbicida depende criticamente da estratégia de amostragem, pois ela define quais indivíduos representam a população-alvo e, consequentemente, quais respostas serão capturadas em bioensaios como os de curvas dose–resposta (Jasieniuk *et al.*, 1996; Beckie *et al.*, 1999; Burgos *et al.*, 2013). Na prática, é comum a amostragem em bulk (mistura de sementes de múltiplos indivíduos) coletada em áreas de escapes, frequentemente sem controle explícito da contribuição materna e/ou do grau de parentesco entre plântulas avaliadas (Burgos *et al.*, 2013; Markus *et al.*, 2024; Martins *et al.*, 2024; Oliveira Jr. *et al.*, 2025).

Nessas condições, as repetições experimentais podem não corresponder a unidades genéticas independentes, caracterizando pseudorreplicação genética e reduzindo a variabilidade efetivamente representada no ensaio (Hurlbert, 1984). Como consequência, parâmetros da curva (por exemplo, GR_{50} , GR_{80} e inclinação) podem ser deslocados, superestimando ou subestimando a sensibilidade populacional e reduzindo a reprodutibilidade genética e a comparabilidade entre ensaios (Hurlbert, 1984; Seefeldt *et al.*, 1995; Beckie *et al.*, 1999; Burgos *et al.*, 2013).

Diante disso, este estudo comparou curvas dose–resposta obtidas por (i) um *bulk* com controle de contribuição materna, por meio de estruturação por progênies/famílias (Vencovsky *et al.*, 2007) visando equalizar a contribuição genética,

e (ii) um delineamento baseado em progênies, no qual a unidade genética é explicitamente definida.

Testamos a hipótese de que a redução da variabilidade genética efetivamente amostrada altera a forma e os parâmetros estimados da curva, afetando a inferência sobre resistência em nível populacional.

2. 2 MATERIAL E MÉTODOS

2. 2. 1 Coletas de sementes e formação do “*bulk*”

Sementes de *Eleusine indica* foram coletadas a partir de 19 plantas individuais (plantas-mãe) na região de Lençóis Paulista, estado de São Paulo, Brasil. As sementes provenientes de cada planta-mãe foram mantidas separadas para a constituição de 19 progênies maternas. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (temperatura média de 27 °C) no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia, Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP.

Para compor a amostra agregada (“*bulk*”), foram selecionadas 50 sementes de cada uma das 19 progênies, reunidas e homogeneizadas, formando um lote único com contribuição equivalente de cada planta-mãe. O *bulk* foi utilizado para condução de uma curva dose–resposta “tradicional”, permitindo a comparação entre: (i) uma abordagem baseada em progênies maternas, que preserva a estrutura genética amostrada na população; e (ii) uma abordagem convencional baseada em amostragem agregada (*bulk*).

2. 2. 2 Curvas dose - resposta, condições gerais

A resposta diferencial entre as abordagens (progênies vs *bulk*) foi avaliada utilizando-se glifosato, herbicida inibidor da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), pertencente ao HRAC Grupo 9.

Para ambas as abordagens, foram avaliadas sete doses de glifosato: 0 (testemunha); 67,5; 270; 540; 1.080; 2.160 e 4.320 g e.a. ha⁻¹. As plântulas foram tratadas no estágio fenológico BBCH-22, caracterizado pela presença de dois

perfilhos visíveis (Hess *et al.*, 1997). A unidade experimental foi constituída por um vaso de 0,8 L contendo uma plântula

As sementes foram germinadas previamente em vasos do tipo jardineira (5 L), contendo substrato comercial Carolina Soil (EC = 0,7 mS cm⁻¹; pH = 5,5). As plântulas foram transplantadas para os vasos (0,8 L).

A aplicação do herbicida foi realizada em pulverizador estacionário instalado em sala fechada (3 m × 2 m), com carrinho suspenso a 2,5 m de altura. A barra de pulverização foi composta por quatro pontas XR 110.02 VS, espaçadas em 0,5 m, posicionadas a 0,5 m acima dos vasos. O sistema operou à velocidade de 3,6 km h⁻¹ (45,0 Hz no modulador de frequência), com volume de calda de 200 L ha⁻¹. A pressão de trabalho foi mantida constante em 1,5 bar, por ar comprimido.

Aos 35 dias após a aplicação (DAA), as plantas foram colhidas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 72 h, sendo posteriormente pesadas para determinação da massa seca.

2. 2. 3 Curva dose resposta baseada em progênes maternas

A curva dose–resposta baseada em progênes foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 19 (progênes) × 7 (doses) × 4 (repetições). Cada repetição consistiu em uma planta por vaso (0,8 L), oriunda da germinação da respectiva progênie materna em jardineira (5 L) e transplantada para a unidade experimental.

2. 2. 4 Curva dose resposta tradicional (*bulk*)

A curva dose–resposta tradicional foi conduzida utilizando o *bulk* de sementes, em delineamento inteiramente casualizado, com 7 doses e 6 repetições por dose. Cada repetição consistiu em uma planta por vaso (0,8 L), oriunda de germinação do *bulk* em jardineira (5 L) e transplantada para a unidade experimental.

2. 2. 5 Obtenção das curvas dose respostas e GR_y (redução de crescimento).

As curvas dose–resposta foram ajustadas para a variável massa seca, utilizando modelos não lineares. Inicialmente, a massa seca de cada unidade

experimental foi convertida em biomassa relativa (%), padronizada pela testemunha, para reduzir diferenças iniciais de vigor e permitir comparabilidade direta entre curvas (Streibig, 1988; Ritz *et al.*, 2015). Para cada progênie i , repetição r e dose d , a biomassa relativa foi calculada como:

$$RB_{i,r,d} = 100 \times \frac{MS_{i,r,d}}{\bar{MS}_{i,0}}$$

em que $RB_{i,r,d}$ é a biomassa relativa (%), $MS_{i,r,d}$ é a massa seca na dose d , repetição r , e $\bar{MS}_{i,0}$ é a média da massa seca da testemunha ($d = 0$) da progênie i .

Em seguida, foram ajustados modelos log-logísticos de quatro parâmetros (LL.4) para descrever a relação entre dose do herbicida (d) e a biomassa relativa (RB) (Ritz *et al.*, 2015):

$$RB(d) = c + \frac{d_{\max} - c}{1 + \exp\{b[\log(d) - \log(e)]\}}$$

em que $d_{\max}$ representa a assíntota superior (biomassa relativa máxima), c a assíntota inferior (biomassa residual em doses elevadas), b a inclinação da curva em torno do ponto de inflexão e e o parâmetro associado à dose no ponto de inflexão.

Foram estimadas doses efetivas ED_x ($x = 20, 30, 40, 50, 60, 70$ e 80%), obtidas por regressão inversa a partir do modelo LL.4. Por se tratar de redução de biomassa (growth reduction), ED_x foi interpretada e reportada como GR_x . Assim, GR_x representa a dose necessária para reduzir a biomassa em $x\%$, o que equivale a atingir o nível $y = 100 - x\%$ da testemunha.

Para a abordagem baseada em progênies individuais, um modelo LL.4 foi ajustado separadamente para cada progênie i , obtendo-se curvas por progênies e as doses efetivas associadas aos níveis de redução.

A dose GR_y (equivalente a ED no nível y , em % da testemunha) foi obtida por regressão inversa do modelo LL.4 (Finney, 1971; Streibig, 1988; Ritz *et al.*, 2015):

$$GR_y = e \times \left[\left(\frac{d_{\max} - c}{y - c} - 1 \right) \right]^{1/b}$$

considerando $c < y < d_{\max}$, de modo que o nível de y seja atingível pela curva ajustada.

Para sintetizar as estimativas de GR_y entre progênies, foi utilizada a média geométrica das $GR_{y,i}$ estimadas para cada progênie i , apropriadamente para parâmetros positivos e para interpretação em escala multiplicativa (Finney, 1971; Ritz *et al.*, 2015):

$$GR_{y,ind} = exp \times \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \ln (GR_{y,i}) \right)$$

em que n é o número de progênies avaliadas.

Para a abordagem tradicional (*bulk*), um único modelo LL.4 foi ajustado aos dados de biomassa relativa do *bulk*, obtendo-se a estimativa $GR_{y,bulk}$ por regressão inversa do modelo, conforme descrito acima (Streibig, 1988; Ritz *et al.*, 2015).

2. 2. 6 Comparação entre abordagens e quantificação de incerteza

Para verificar se a curva dose–resposta obtida a partir das progênies maternas diferia da curva tradicional baseada no *bulk*, realizamos uma comparação formal entre modelos dose–resposta ajustados no ambiente R com o pacote *drc*, conforme descrito por Ritz *et al.* (2015). Inicialmente, ajustamos um modelo global assumindo que ambas as abordagens poderiam ser descritas por um conjunto comum de parâmetros (isto é, uma única curva). Em seguida, ajustamos modelos alternativos aninhados, permitindo que parâmetros específicos variassem entre os grupos (*bulk* vs. progênies), o que possibilitou testar, de forma dirigida, se as curvas diferiam principalmente na posição do ponto de inflexão (e , equivalente a GR_{50}), na inclinação (b) ou na biomassa residual em doses elevadas (c), componentes com interpretação biológica direta em bioensaios com herbicidas (Streibig, 1988; Ritz *et al.*, 2015).

A evidência estatística para preferir o modelo mais complexo foi avaliada por testes de razão de verossimilhança (LRT) entre modelos aninhados (parâmetros compartilhados vs. específicos), como implementado no *drc* (Ritz *et al.*, 2015).

A estatística do teste foi calculada como:

$$LR = 2(l_1 - l_0),$$

Em que, l_0 e l_1 representam as log-verossimilhanças máximas dos modelos reduzido e alternativo, respectivamente. O valor LR foi comparado a uma distribuição X^2 com graus de liberdade iguais à diferença no número de parâmetros entre os modelos, conforme a conexão clássica entre LRT e deviance em modelos ajustados por máxima verossimilhança (Dobson; Barnett, 2008).

A incerteza associada às estimativas foi tratada em duas frentes. Primeiro, para os parâmetros do modelo e para doses efetivas derivadas GR_y , utilizamos a inferência padrão do ajuste no *drc* (p.ex., métodos baseados em delta/perfil de verossimilhança

para parâmetros derivados), conforme descrito por Ritz *et al.* (2015). Segundo, para a estimativa populacional obtida a partir do conjunto de progênies, quantificamos a incerteza por bootstrap no nível das progênies, preservando a progênie como unidade genética de reamostragem: em cada iteração, em um total de 20.000 interações, as progênies foram reamostradas com reposição, a dose populacional (ex.: GR_{80}) foi recalculada, e o IC95% foi obtido pelos percentis 2,5% e 97,5% da distribuição bootstrap (Efron; Tibshirani, 1993).

2. 3 RESULTADOS

2. 3. 1 Comparação estrutural dos modelos de dose-resposta

A análise de dose-resposta demonstrou que a metodologia de amostragem de sementes afeta significativamente a caracterização fenotípica da resistência. O teste global de Razão de Verossimilhança (LRT) revelou uma diferença estatisticamente significativa entre a curva ajustada para a mistura de sementes (*bulk*) e a curva populacional derivada da média geométrica das progênies individuais (LRT = 9,84; df = 4; $p = 0,0432$) (Figura 1; Tabela 1).

A decomposição do modelo evidenciou que essa divergência não ocorreu no parâmetro de inflexão da curva (e ; $p = 0,2227$), indicando que ambas as metodologias estimam a dose letal mediana de forma semelhante. As diferenças estruturais concentraram-se na inclinação da curva (b ; $p = 0,0032$) e no limite inferior de biomassa residual (c ; $p = 0,0060$). Isso demonstra que, embora o comportamento inicial da população pareça semelhante em ambas as abordagens, a taxa de redução da biomassa e a sobrevivência residual em altas doses divergem significativamente quando a estrutura de famílias é ignorada.

Figura 1 - Curvas de dose-resposta (modelo log-logístico LL.4) comparando a redução da biomassa relativa de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) em resposta a doses crescentes do herbicida glifosato.

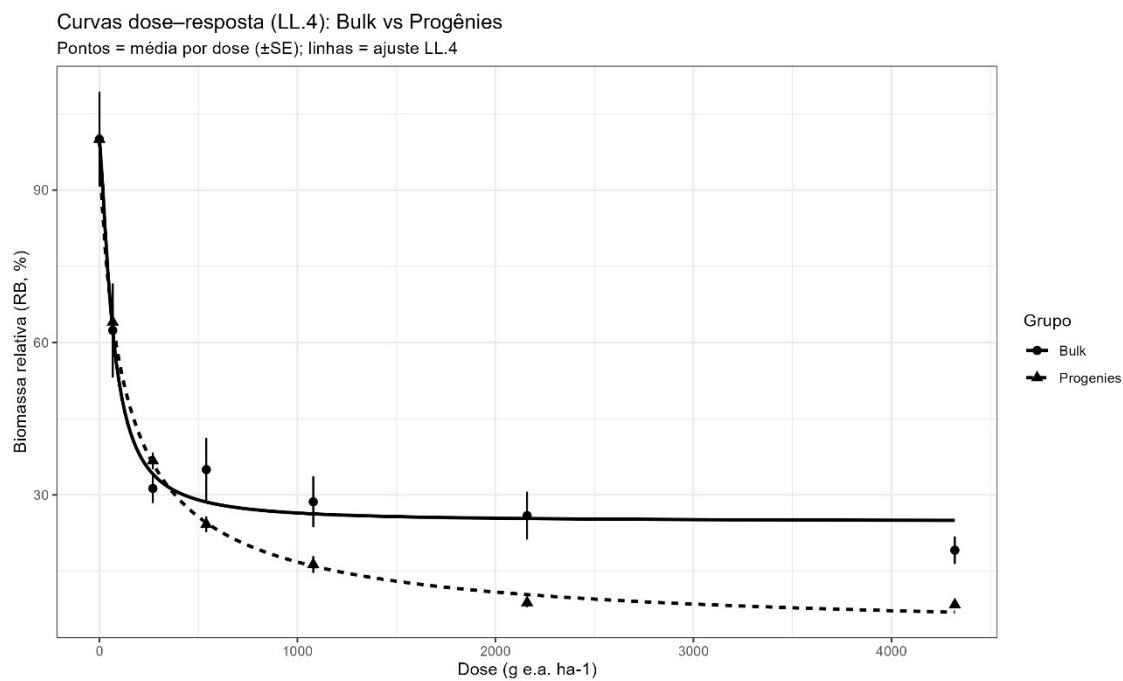


Tabela 1 - Testes de Razão de Verossimilhança (LRT) para comparação dos parâmetros do modelo log-logístico de quatro parâmetros (LL.4) entre as abordagens de *Bulk* e *Progenies*.

Comparação de Modelos	Graus de Liberdade (df)	Razão de Verossimilhança (LRT)	Valor de <i>p</i>
Modelo Global (Curva única vs. Grupos)	4	9,84	0,0432*
Diferença no parâmetro <i>e</i> (GR50)	1	1,487	0,2227 ^{ns}
Diferença no parâmetro <i>b</i> (Inclinação)	1	8,663	0,0032**
Diferença no parâmetro <i>c</i> (Platô inferior)	1	7,551	0,006**
Diferença no parâmetro <i>d</i> (Platô superior)	1	0,092	0,7619 ^{ns}

Nota: ns = não significativo; *significativo a 5%; ** significativo a 1%.

2. 3. 2 Estimativas de doses efetivas e a limitação do método *Bulk*

A semelhança estatística no parâmetro e refletiu-se nos valores absolutos do GR_{50} , estimados em 117,00 g e.a. ha⁻¹ para o *bulk* e 120,66 g e.a. ha⁻¹ para as progênes (Tabela 2). A divergência entre os métodos tornou-se progressivamente maior à medida que se exigiram maiores níveis de controle.

Para alcançar 70% de redução de biomassa (GR_{70}), o modelo de *bulk* superestimou a dose necessária (534,51 g e.a. ha⁻¹) em comparação com a população baseada em progênes (365,58 g e.a. ha⁻¹). Mas a curva gerada pelo método de *bulk* não foi capaz de fornecer uma estimativa biologicamente válida para o GR_{80} (80% de controle), pois o platô inferior da mistura estabilizou acima desse nível de controle. Em contrapartida, a manutenção da identidade das famílias permitiu estimar o GR_{80} populacional em 715,54 g e.a. ha⁻¹ (IC 95%: 585,24 – 883,24).

Tabela 2. Estimativas das doses necessárias para redução de 20% a 80% da biomassa (GR_{20} a GR_{80}), em g e.a. ha⁻¹, utilizando o método de *bulk* e a média geométrica das Progênes individuais (com Intervalo de Confiança Bootstrap de 95%).

Nível de Redução	<i>Bulk</i> (g.e.a.ha ⁻¹) ¹⁾	Progênes (g.e.a.ha ⁻¹)	IC 95% Bootstrap (Progênes)
GR_{20}	25,82	16,63	[7,79 – 32,43]
GR_{30}	44,45	36,65	[21,58 – 58,87]
GR_{40}	71,76	68,85	[48,30 – 95,96]
GR_{50}	117	120,66	[95,96 – 150,72]
GR_{60}	209,87	207,36	[175,66 – 246,76]
GR_{70}	534,51	365,58	[309,21 – 437,80]
GR_{80}	N/A*	715,54	[585,24 – 883,24]

*Nota: N/A = Estimativa não disponível. O platô inferior do modelo *Bulk* impossibilitou o cálculo da dose para 80% de controle.

2. 3. 3 Variabilidade fenotípica e diversidade oculta

A incapacidade do método *Bulk* em modelar respostas a altas doses está diretamente ligada à extrema heterogeneidade fenotípica observada quando a população é desmembrada em famílias (Tabela 3).

Tabela 3 - Amplitude fenotípica observada entre as 19 progênies avaliadas para os parâmetros de GR_{50} e GR_{80} (g.e.a. ha⁻¹).

Estatística Descritiva	Estimativa para GR_{50}	Estimativa para GR_{80}
Progênie mais sensível (Mínimo)	36,38	369,97
Mediana populacional	118,63	704,26
Progênie mais resistente (Máximo)	285,36	2.211,39

A análise das 19 progênies válidas revelou uma amplitude de suscetibilidade ao herbicida. Enquanto a família mais sensível apresentou um GR_{80} de apenas 369,97 g.e.a. ha⁻¹, a progênie de maior sobrevivência demandou 2.211,39 g.e.a. ha⁻¹ para o mesmo nível de controle (uma variação superior a cinco vezes dentro da mesma população). Ao misturar as sementes na abordagem de *bulk*, os indivíduos altamente resistentes foram diluídos na amostra, mascarando a presença de genótipos de difícil controle que se sobressaem em doses comerciais elevadas.

2. 4 DISCUSSÃO

2. 4. 1 O efeito de diluição e a modelagem dose-resposta

Os resultados deste capítulo demonstram que o método tradicional de amostragem populacional por mistura de sementes (*bulk*) subestima a capacidade de sobrevivência de genótipos resistentes de *Eleusine indica* (L.) Gaertn ao herbicida glifosato. Embora a abordagem em *bulk* seja amplamente preconizada e historicamente padronizada em programas de monitoramento de resistência em larga escala (Beckie *et al.*, 2000; Burgos *et al.*, 2013) pela sua viabilidade operacional, nossos dados revelam que esta metodologia cria um "efeito de diluição" fenotípica. Ao

misturar sementes de múltiplos indivíduos, a resposta dos biótipos mais tolerantes é ofuscada pela massa de indivíduos suscetíveis, resultando em uma estimativa populacional distorcida. Isso corrobora o alerta ecológico de que o agrupamento prévio de amostras (pooling) sacrifica o conhecimento sobre a variância biológica natural (Hurlbert, 1984).

Estatisticamente, isso é evidenciado pela análise de decomposição dos parâmetros do modelo log-logístico. A utilização de curvas dose-resposta não lineares é o método mais robusto para dissecar o comportamento toxicológico de populações infestantes (Streibig, 1988; Ritz *et al.*, 2015).

A ausência de diferença significativa no parâmetro e (GR_{50}) indica que a tendência central da população é mantida em ambas as metodologias. No entanto, a diferença significativa na inclinação da curva (b) e no limite inferior (c) reflete a incapacidade do *bulk* em capturar a sobrevivência residual. Na prática, a curva de *bulk* assume uma queda abrupta e estabiliza prematuramente, falhando em refletir a realidade de que uma fração da população continua a acumular biomassa mesmo sob forte pressão química.

2. 4. 2 Implicações agronômicas: o perigo das sub-doses e a evolução da resistência

A limitação metodológica do *bulk* torna-se crítica no contexto do manejo de *E. indica*, uma espécie infestante agressiva que tem apresentado rápida expansão de biótipos resistentes e múltiplos casos de falhas de controle, com severos impactos econômicos nos sistemas de produção agrícola brasileiros (Albrecht *et al.*, 2025; Beckie *et al.*, 2019). O fato de o modelo baseado em *bulk* não ter sido capaz de estimar o GR_{80} (Tabela 2) poderia induzir técnicos à recomendação de doses insuficientes para controlar a fração mais resistente da população no campo.

A desestruturação desta população em famílias revelou a verdadeira magnitude da resistência: a presença de genótipos capazes de suportar até 2.211,39 g e.a. ha⁻¹ para atingir 80% de redução de biomassa. Quando recomendações de herbicidas são baseadas na resposta média de amostragens agregadas, a dose comercial atua como uma dose sub-letal para as progênes situadas no extremo da curva. O uso contínuo de doses sub-letais é reconhecido como o principal motor para a evolução da resistência e o rápido acúmulo de alelos de menor efeito, conforme demonstrado por

Neve e Powles (2005). A sobrevivência contínua desses indivíduos elimina a competição intraespecífica e impulsiona a reprodução diferencial dos genótipos de mais difícil controle, gerando rápidos saltos de resistência populacional (Busi e Powles, 2009; Busi *et al.*, 2012).

2. 4. 3 Da variabilidade fenotípica preexistente à genética quantitativa

A detecção desta "resistência oculta" alinha-se à compreensão moderna de que a rápida adaptação a herbicidas é frequentemente impulsionada pela ampla variabilidade preexistente (standing genetic variation) no interior das populações (Neve, 2005; Kreiner *et al.*, 2018). A heterogeneidade fenotípica revelada pelas curvas individuais demonstra que esta população de capim-pé-de-galinha possui um reservatório adaptativo sobre o qual a seleção atua. Esta complexa arquitetura poligênica é frequentemente o alicerce para a evolução da resistência não relacionada ao local de ação (NTSR) (Yuan *et al.*, 2007; Renton *et al.*, 2014).

Contudo, a compreensão isolada da variação fenotípica não permite prever com exatidão a futura trajetória evolutiva da espécie sob aplicações de glifosato. Conforme os preceitos fundamentais da genética quantitativa (Falconer; Mackay, 1996), a resposta à seleção depende de quanto dessa variação fenotípica observada nas curvas é de natureza genética aditiva e transmissível à progênie. Torna-se importante particionar essas variâncias para quantificar a herdabilidade ou evolvabilidade da resistência nesta população. Parâmetros que constituem o escopo de investigação dos próximos capítulos desta dissertação.

2. 5 CONCLUSÃO

A prática tradicional de misturar amostras de sementes (*bulk*) acaba mascarando os indivíduos de *Eleusine indica* (L.) Gaertn mais tolerantes ao glifosato. Ao diluir a resposta das plantas extremas na média da população, esse método nos induz a subestimar a dose real necessária para um controle eficiente no campo.

Conclui-se, portanto, que manter a identidade das famílias (avaliando as progênies individualmente) é um passo essencial para revelar essa "resistência oculta", garantindo recomendações de manejo muito mais seguras e fiéis à realidade

agrícola. Mais do que isso, a enorme variação observada deixa um alerta prático: a espécie possui alto potencial de adaptação. Para prever como essa evolução ocorrerá de fato nas próximas gerações, o caminho natural é desvendar a base genético-quantitativa por trás da variação.

REFERENCIAS

- ALBRECHT, A. J. P.; BIFFE, D. F.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; ALBRECHT, L. P.; OLIVEIRA JR., R. S. (ed.). Capim-pé-de-galinha: fundamentos e recomendações para manejo. Botucatu: **FEPAF**, 2025. 131 p. ISBN: 978-65-89571-19-3. DOI: 10.54236/9786589571193.
- BECKIE, H. J.; HARKER, K. N. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1045–1052, 2017.
- BECKIE, H. J.; HEAP, I. M.; SMEDA, R. J.; HALL, L. M. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, v. 14, n. 2, p. 428–445, 2000.
- BECKIE, H. J.; ASHWORTH, M. B.; FLOWER, K. C. Herbicide resistance gene flow in weeds: under-estimated and under-appreciated. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 283, p. 106566, 2019.
- BURGOS, N. R.; TRANEL, P. J.; STREIBIG, J. C.; DAVIS, V. M.; SHANER, D.; NORSWORTHY, J. K.; RITZ, C. Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 4–20, 2013.
- BUSI, R.; POWLES, S. B. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. **Heredity**, v. 103, n. 4, p. 318–325, 2009.
- BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 2, p. 231–242, 2012.
- DOBSON, A. J.; BARNETT, A. G. An introduction to generalized linear models. 3. ed. Boca Raton: **Chapman and Hall/CRC**, 2008. 307 p.
- EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. J. An introduction to the bootstrap. New York: **Chapman and Hall**, 1993. 436 p.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. Introduction to quantitative genetics. 4. ed. Harlow: **Longman**, 1996. 464 p.
- FINNEY, D. J. Probit analysis. 3. ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1971. 333 p.
- HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [S. l.], 2026. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 05 maio 2026.
- HESS, M.; FOY, G.; ROTH-BEJERANO, N.; NIMZOWITZ-COHEN, B. Use of the extended BBCH scale — general for the description of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, v. 37, n. 6, p. 433–441, 1997.

HURLBERT, S. H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological Monographs**, v. 54, n. 2, p. 187–211, 1984.

JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, n. 2, p. 176–193, 1996.

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

MARKUS, C.; MEROTTO JR., A.; KROTH, W. A. E.; KROTH, L. V. E.; SULZBACH, E.; BOLZAN, R. J. B. Avaliação da ocorrência e distribuição de populações de capim-arroz escapes aos herbicidas no estado do Rio Grande do Sul. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 5, n. 3, 08 ago. 2024. ISSN: 2675-4150. Disponível em: www.hrac-br.org.

MARTINS, H. L.; BACHA, A. L.; MARTINS, J. V. F.; ALVES, P. L. C. A. Mapeamento da resistência de capim-amargoso a herbicidas no estado da Bahia. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 5, n. 2, 01 ago. 2024. ISSN: 2675-4150. Disponível em: www.hrac-br.org.

NEVE, P.; POWLES, S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1154–1166, 2005. DOI: 10.1007/s00122-005-1947-2.

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

OLIVEIRA JR., R. S.; WITTER, A. P. W.; FERREIRA, L. A. I.; GRANZIOLI, L.; BARION, J. H.; PASQUALOTO, S. P.; BIFFE, D. F.; CONSTANTIN, J. Monitoramento de resistência em biótipos de *Digitaria insularis* e *Eleusine indica* no Brasil. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 6, n. 1, 31 out. 2025. ISSN: 2675-4150. Disponível em: www.hrac-br.org.

RENTON, M.; BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Herbicide resistance modelling: past, present and future. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1394–1404, 2014.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, e0146021, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0146021.

SEEFELDT, S. S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v. 9, n. 2, p. 218–227, 1995.

STREIBIG, J. C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v. 28, n. 6, p. 479–484, 1988.

VENCOVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. F. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: Recursos genéticos vegetais. Brasília: **EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART JR., C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 6–13, 2007. p. 232–282.

CAPÍTULO 3

ESTADO OPERACIONAL DE RESISTÊNCIA (R*) EM *Eleusine indica* (L.) Gaertn.

3. 1 INTRODUÇÃO

A resistência de plantas daninhas a herbicidas não surgiu do acaso. Ela é, em sua essência, uma consequência evolutiva previsível: ao submeter repetidamente uma população à intensa pressão seletiva imposta pelo uso contínuo de um mesmo herbicida, a seleção age sobre a variabilidade genética pré-existente, enriquecendo progressivamente a frequência de indivíduos capazes de sobreviver sob doses que, originalmente, controlavam a espécie (Jasieniuk *et al.*, 1996; Christoffoleti; López-Ovejero, 2004; Vencill *et al.*, 2012).

Cinco décadas de registros globais documentaram esse processo em mais de 500 biótipos de 270 espécies, com o glifosato figurando entre os herbicidas de maior histórico de casos confirmados no mundo (Heap, 2026). Longe de ser um evento isolado, a resistência é hoje reconhecida como um desfecho quase inevitável quando a pressão de seleção é intensa, contínua e aplicada sobre populações com variação genética suficiente para sustentar a resposta adaptativa (Neve, 2009; Kreiner *et al.*, 2018).

Nesse cenário, a *Eleusine indica* (L.) Gaertn. (Capim-pé-de-galinha) ocupa uma posição de destaque entre as espécies problemáticas no contexto agrícola brasileiro. Sua ampla distribuição em sistemas de culturas anuais, aliada à capacidade de evolução de resistência a múltiplos mecanismos de ação, torna-a um dos alvos mais complexos para o manejo químico (Albrecht *et al.*, 2025).

Entre os mecanismos já documentados, destacam-se a resistência ao glifosato, com mecanismo de ação que inibem a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) e que pode se manifestar tanto por mutações no sítio-alvo quanto por mecanismos de absorção e translocação reduzidas (Christoffoleti *et al.*, 2009; Powles; Yu, 2010; Sammons, 2014). O monitoramento sistemático realizado no Brasil tem identificado biótipos de *E. indica* com baixa suscetibilidade ao glifosato em múltiplos estados, incluindo casos de resistência cruzada e múltipla que ampliam a urgência do problema (Oliveira Jr. *et al.*, 2025).

Embora os protocolos convencionais de diagnóstico de resistência (estruturados em ensaios de dose-resposta e expressão dos parâmetros GR_{50} ou GR_{80} pela curva logística) contribuam para a detecção e caracterização de populações resistentes (Stribig, 1988; Beckie *et al.*, 2000; Ritz *et al.*, 2015), eles carregam uma limitação conceitual que raramente é discutida: descrevem o comportamento médio da população e, ao fazê-lo, não capturam adequadamente a estrutura interna de variabilidade que sustenta a dinâmica evolutiva da resistência.

Em particular, quando a resistência se encontra ainda em seus estágios iniciais de estabelecimento, os parâmetros médios da curva (como o GR_{50} e o parâmetro de inclinação) revelam pouca sensibilidade para sua detecção (Burgos *et al.*, 2013). A consequência prática é que populações podem ser equivocadamente classificadas como suscetíveis mesmo quando já abrigam, em nível de progênie, indivíduos com plena capacidade funcional de resistência.

Foi exatamente essa lacuna diagnóstica que motivou a proposição de um conceito operacionalmente distinto: o Estado Operacional de Resistência, ou R^* (Operational Resistance State). R^* não é um marcador molecular, tampouco uma mutação pontual em um gene específico. É uma abstração funcional que coloca a pergunta essencial do ponto de vista agrônomo e evolutivo: um indivíduo consegue desempenho suficiente para sobreviver e se reproduzir sob a dose-alvo de campo?

A operacionalização desse conceito é direta: um indivíduo é classificado como R^* quando sua biomassa relativa em relação à testemunha não tratada (MSR) é igual ou superior a 30% após exposição à dose discriminatória correspondente à dose de escolhida do herbicida.

Esse limiar representa o ponto a partir do qual o indivíduo preserva capacidade reprodutiva mínima para transmitir o fenótipo à geração seguinte (Falconer; Mackay, 1996). Abaixo desse limiar, o indivíduo é classificado como suscetível (S). A classificação, portanto, transforma um gradiente fenotípico contínuo em uma variável binária vinculada diretamente ao desfecho agrônomo da seleção, ancorada na teoria de caracteres de limiar (threshold traits) da genética quantitativa (Falconer; Mackay, 1996; Hartl; Clark, 2010).

A adoção de uma abordagem binária fundamentada na teoria de eventos raros e na estatística binomial é particularmente adequada para o estágio de detecção precoce da resistência. A frequência de alelos de resistência em populações ainda

não expostas, ou recentemente expostas, é geralmente muito baixa, podendo variar de 10^{-5} a 10^{-4} dependendo do mecanismo e da espécie (Preston; Powles, 2002).

Nesses cenários de eventos raros, a probabilidade de detectar ao menos um indivíduo R^* em uma amostragem de n progênies, dada uma frequência real p na população, é descrita pela expressão: $P(x \geq 1) = 1 - (1 - p)^n$ (Ross, 2010). Com 19 progênies como unidades genéticas independentes, o protocolo garante um poder de detecção de 99% para frequências populacionais iguais ou superiores a 21,5%, conferindo sensibilidade estatística adequada para o estágio de estabelecimento investigado (Ross, 2010; Vencovsky *et al.*, 2007).

O uso de progênies é fundamental nesse contexto. Cada família constitui uma unidade genética independente, portadora de uma estrutura alélica particular herdada da planta-mãe, o que permite identificar a herança do fenótipo de resistência e distinguir eventos genuinamente genéticos de variações plásticas ou ruído experimental (Hurlbert, 1984; Vencovsky *et al.*, 2007). A substituição de unidades genéticas por unidades meramente amostrais configura uma forma de pseudorreplacação que compromete a inferência sobre a variabilidade genética real da população (Hurlbert, 1984; Jasieniuk *et al.*, 1996).

É igualmente importante considerar que a resistência ao glifosato em *E. indica* pode se manifestar por mecanismos distintos: resistência no sítio-alvo (TSR — Target-Site Resistance), como mutações na EPSPS que comprometem a ligação do herbicida; e resistência fora do sítio-alvo (NTSR — Non-Target-Site Resistance), como metabolização aumentada por citocromos P450, ou redução na absorção e translocação sistêmica (Christoffoleti *et al.*, 2009; Powles; Yu, 2010; Yuan *et al.*, 2007). A NTSR é particularmente insidiosa: frequentemente poligênica, herdável de forma contínua e capaz de conferir resistência múltipla e cruzada de forma inesperada, representando uma ameaça crescente em sistemas agrícolas sob alta pressão seletiva (Yuan *et al.*, 2007; Kreiner *et al.*, 2018).

A divisão TSR/NTSR, embora útil para fins de descrição mecanística, é insuficiente para explicar como a resistência emerge e se consolida em nível populacional, pois a seleção natural não opera sobre mecanismos isolados. É exatamente esse fenótipo integrado, independente do mecanismo subjacente e de suas interações com o ambiente ($G \times E$), que o R^* captura, conferindo ao diagnóstico uma robustez operacional que transcende as classificações moleculares convencionais (Neve, 2009).

Diante desse panorama, o presente capítulo tem como objetivo avaliar a presença e o estágio de estabelecimento da resistência funcional ao glifosato em *Eleusine indica* em nível populacional, utilizando progênies como unidades genéticas independentes e aplicando o critério R^* como ferramenta de classificação fenotípica binária.

A hipótese central é de que a resistência funcional já está estabelecida na população estudada, sendo detectável em ao menos uma das 19 progênies avaliadas sob a dose discriminatória de campo ($2.160 \text{ g e.a. ha}^{-1}$), e que a frequência estimada de R^* é consistente com uma infestação populacionalmente, com implicações diretas para as estratégias de manejo da espécie.

3. 2 MATERIAL E MÉTODOS

3. 2. 1 Material Vegetal e condições experimentais

O material vegetal utilizado neste capítulo é proveniente da mesma amostragem descrita no Capítulo 2. Sementes de *Eleusine indica* foram coletadas a partir de 19 plantas individuais (plantas-mãe) na região de Lençóis Paulista, estado de São Paulo, Brasil, e mantidas separadas para a constituição de 19 progênies maternas, cada uma representando uma unidade genética independente. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com temperatura média de 27°C , no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia, Faculdade de Ciências Agrônômicas — UNESP, Câmpus de Botucatu.

As sementes foram previamente germinadas em vasos do tipo jardineira (5 L), contendo substrato comercial Carolina Soil ($\text{CE} = 0,7 \text{ mS cm}^{-1}$; $\text{pH} = 5,5$). Após a emergência e estabelecimento das plântulas, foram selecionados quatro indivíduos aleatórios por progênie, os quais foram transplantados para vasos individuais de 0,8 L para a condução do bioensaio de classificação fenotípica.

3. 2. 2 Condições gerais de aplicação e coleta

O herbicida utilizado foi o glifosato, inibidor da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), pertencente ao Grupo 9 do HRAC. A aplicação foi

realizada quando as plântulas atingiram o estágio fenológico BBCH-22, caracterizado pela presença de dois perfilhos visíveis (Hess *et al.*, 1997). A unidade experimental foi constituída por um vaso de 0,8 L contendo uma plântula.

A aplicação do herbicida foi realizada em pulverizador estacionário equipado com quatro pontas XR 110.02 VS, velocidade de deslocamento de 3,6 km h⁻¹, pressão de trabalho de 1,5 bar e volume de calda de 200 L ha⁻¹. Aos 35 dias após a aplicação (DAA), as plantas foram colhidas individualmente, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 72 horas, para determinação da massa seca da parte aérea.

3. 2. 3 Delineamento experimental e doses

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial composto por 19 progênies maternas × 2 doses de glifosato × 4 repetições, totalizando 152 unidades experimentais. As duas doses avaliadas foram: 0 g e.a. ha⁻¹ (testemunha sem aplicação) e 2.160 g e.a. ha⁻¹, que correspondente à 540 g e.a. ha⁻¹ a mais da maior dose recomendada para o controle da espécie em condições de campo.

A adoção de apenas duas doses, é metodologicamente adequada para o objetivo deste capítulo, que não é estimar curvas dose-resposta, mas sim classificar fenotipicamente cada progênie quanto à sua capacidade funcional de sobrevivência sob pressão seletiva de campo.

3. 2. 4 Obtenção da biomassa relativa (MSR)

A biomassa de cada planta foi convertida em Massa Seca Relativa (MSR), expressa como proporção da biomassa média das plantas do grupo testemunha (dose zero) da respectiva progênie, conforme a expressão:

$$MSR_i = \frac{Y_i}{\bar{Y}_{controle}}$$

em que Y_i é a massa seca individual da planta tratada com herbicida e $\bar{Y}_{controle}$ é a média aritmética da massa seca das plantas da mesma progênie submetidas à dose zero. A MSR varia de zero (mortalidade total) a valores iguais ou próximos a 1 (ausência de efeito), e constitui a variável contínua subjacente à posterior

classificação fenotípica binária (Streibig, 1988; Seefeldt *et al.*, 1995; Ritz *et al.*, 2015). A normalização intraclasse, dentro de cada progênie, foi adotada para eliminar o efeito de variação ambiental entre vasos e lotes de cultivo, garantindo que a *MSR* reflita exclusivamente a resposta diferencial ao herbicida, independente da biomassa absoluta de cada família.

3. 2. 5 Definição do Estado Operacional de Resistencia (R^*) e critério de classificação

A classificação fenotípica de cada planta foi realizada com base no conceito de Estado Operacional de Resistência (Operational Resistance State, R^*). O R^* não constitui um marcador molecular, tampouco uma mutação específica, seja no sítio-alvo (target-site resistance, TSR) ou fora dele (non-target-site resistance, NTSR) (Yuan *et al.*, 2007), mas uma abstração funcional que expressa a capacidade de um indivíduo de sobreviver e manter desempenho mínimo sob a dose-alvo de campo, independentemente do mecanismo bioquímico subjacente.

Esse enquadramento é especialmente relevante em contextos nos quais a resistência emerge de forma poligênica e aditiva, como observado em populações de *Lolium rigidum* submetidas a seleção continuada por glifosato (Busi; Powles, 2009; Busi *et al.*, 2012), e permite capturar o fenótipo integrado no nível em que a seleção natural efetivamente opera, sobrevive ou morre.

Conceitualmente, o R^* insere-se na teoria de caracteres de limiar (threshold traits) proposta por Falconer e Mackay (1996), pela qual um fenótipo contínuo latente, descrito em estados binários a partir de um limiar crítico que separa os fenótipos com e sem consequências funcionais distintas.

A classificação individual de cada planta obedeceu ao seguinte critério formal:

$$Classificação_i = \begin{cases} R^* & \text{se } MSR_i \geq 0,30 \\ S & \text{se } MSR_i < 0,30 \end{cases}$$

Uma planta foi classificada como R^* quando sua biomassa relativa atingiu valor igual ou superior a 30% em relação à testemunha (redução de biomassa inferior a 70%), correspondendo ao limiar a partir do qual o indivíduo preserva capacidade mínima de sobrevivência, crescimento e reprodução suficientes para transmitir o fenótipo às gerações subsequentes (Burgos *et al.*, 2013). Plantas com $MSR < 0,30$ (redução $\geq 70\%$) foram classificadas como suscetíveis (S).

A classificação no nível de progênie foi determinada de forma conservadora: uma família foi considerada R^* se ao menos uma das quatro plantas que a compõem foi individualmente classificada como R^* . Esse critério é coerente com a estrutura de meios-irmãos das progênies maternas, na qual a variabilidade intraclasse reflete tanto a segregação genética quanto a variância ambiental residual (Falconer; Mackay, 1996; Hartl; Clark, 2010), e com a expectativa de que fenótipos de resistência em frequências populacionais baixas se expressem de forma incompleta no interior das famílias (Kreiner *et al.*, 2018).

3. 2. 6 Sensibilidade amostral e poder de detecção

O poder de detecção do protocolo experimental para identificar a resistência funcional foi avaliado com base na probabilidade binomial de detectar ao menos uma progênie R^* em função da frequência real de resistência na população (p). O modelo binomial é adequado para fenótipos raros em populações estruturadas, nos quais cada unidade amostral é classificada de forma binária e independente (Ross, 2010; Crossa; Vencovsky, 2011). A probabilidade de detectar ao menos um evento resistente em uma amostra de n unidades é descrita por:

$$P(x \geq 1) = 1 - (1 - p)^n$$

em que x é o número de progênies classificadas como R^* e $n = 19$ é o tamanho amostral. A partir dessa expressão, calculou-se a frequência mínima detectável para dois níveis de poder de detecção:

$$P = 0,95 \rightarrow p_{min} \approx 14,5\%$$

Ou

$$P = 0,99 \rightarrow p_{min} \approx 21,5\%$$

Desse modo, o protocolo com $n = 19$ progênies possuem 99% de probabilidade de detectar ao menos uma família R^* caso a frequência real de resistência na área seja igual ou superior a 21,5%. Esse valor representa o limite de sensibilidade operacional do delineamento, análogo às estimativas de frequência inicial de resistência documentadas para outros sistemas planta daninha-herbicida, onde frequências pré-seleção raramente superam 10^{-6} a 10^{-3} para TSR, mas podem ser de magnitude superiores para NTSR de base poligênica (Jasieniuk *et al.*, 1996; Preston; Powles, 2002).

O valor de sensibilidade deve ser interpretado como a resolução mínima de detecção do experimento, e não como a frequência real estimada da resistência na população (Vencovsky *et al.*, 2007)

3. 2. 7 estimativas da frequência R* e intervalos de confiança

A frequência observada de progênies R* foi expressa como proporção do total amostrado ($\frac{k}{n}$, em que k é o número de famílias classificadas como R* e $n = 19$). O limite superior da frequência de R* foi estimado pelo modelo binomial inverso $P(X \geq 1) = 1 - (1 - p)^n$, resolvendo para p o nível de confiança desejado (Crossa; Vencovsky, 2011; Ross, 2010). Com $k = 1$ progênie R* detectada em $n = 19$, o limite superior a 99 % de confiança resulta em $p \leq 21,5\%$, interpretado como o máximo de infestação compatível com os dados observados.

O intervalo de confiança superior é o principal parâmetro de interesse do ponto de vista da gestão de risco, pois delimita a frequência máxima de R* compatível com os dados observados, ou seja, o pior cenário plausível estatisticamente consistente com a amostra, fornecendo uma estimativa conservadora do grau de comprometimento da eficácia do herbicida na área (Kreiner *et al.*, 2018; Heap; Duke; 2017).

Todas as análises estatísticas foram conduzidas no ambiente R (R Core Team, 2024), utilizando funções nativas de distribuição binomial e o pacote binom para estimativas de intervalo de confiança exato.

3. 3 RESULTADOS

3. 3. 1 Biomassa relativa e classificação R*/S

Das 19 progênies de *Eleusine indica* avaliadas com a dose discriminatória de glifosato (2.160 g e.a. ha⁻¹), apenas uma progênie (Família 27) foi classificada como R* (Estado Operacional de Resistência). As demais 18 progênies apresentaram biomassa relativa (MSR) inferior ao limiar de 30 %, sendo classificadas como suscetíveis (S) (Tabela 1).

Tabela 1 - Biomassa relativa média (*MSR*, %) por progênie de *Eleusine indica* na dose discriminatória (2160 g e.a. ha⁻¹) e classificação R*/S.

Progênie	<i>MSR</i> média (%)	<i>MSR</i> máxima individual (%)	Classificação
1	6,4	11,26	S
3	10,2	11,33	S
6	13,3	16,15	S
7	11,4	27,38	S
10	5,1	14,96	S
11	7,9	23,25	S
12	4,8	9,4	S
13	14,0	19,56	S
15	8,6	17,82	S
20	3,4	10,9	S
23	5,8	8,78	S
27	20,8	32,5	R*
28	4,1	8,07	S
34	9,7	20,04	S
35	4,6	14,43	S
37	10,4	17,41	S
38	17,5	29,6	S (limiar)
39	3,9	7,9	S
43	5,4	10,24	S

Dentro da Família 27, duas das quatro plantas avaliadas apresentaram *MSR* $\geq$ 30 % (*MSR* = 32,5 % e 32,3 %), enquanto as outras duas não atingiram o critério (*MSR* = 15,7 % e 2,6 %), resultando em uma *MSR* média de 20,8 % para a progênie. Apesar da *MSR* média da progênie não ultrapassar o limiar individualmente, a detecção de qualquer planta R* dentro da família é suficiente para classificar a progênie como R*, conforme definido pela teoria dos caracteres de limiar threshold traits (Falconer; Mackay, 1996; Hartl; Clark, 2007).

A Família 38 foi a segunda com maior *MSR* média (17,5 %), com valor máximo de 29,6 % (ligeiramente abaixo do critério de 30 %). Essa família foi categorizada na

zona amarela de alerta (próxima ao limiar), evidenciando uma faixa de transição fenotípica (Figura 1). Todas as demais progênes apresentaram MSR média entre 3,4 % (Família 20) e 14,0 % (Família 13), com pico individual máximo bem abaixo do limiar R^* .

3. 3. 2 Frequência e intervalo de confiança R^*

A frequência observada de progênes R^* foi $1/19 = 5,26$ %. Pelo modelo binomial a frequência máxima de resistência compatível com os dados observados na população amostrada foi estimada em aproximadamente em 21,5 % (Ross, 2010; Crossa; Vencovsky, 2011). Esse resultado indica que, embora a frequência pontual seja baixa, a resistência funcional pode estar presente em até um terço da população de origem, tornando a detecção precoce pelo método R^* especialmente relevante do ponto de vista do manejo.

O poder de detecção amostral foi quantificado pela mesma expressão binomial $P(x \geq 1) = 1 - (1 - p)^{19}$, resolvendo para o valor mínimo de p que garante determinado nível de confiança. Com 19 progênes, o experimento possui 95 % de poder para detectar resistência se a frequência real for $\geq 14,5$ %, e 99 % de poder se a frequência real for $\geq 21,5$ %. A detecção efetiva da Família 27 confirma, portanto, que a resistência funcional já está estabelecida ao nível populacional, com frequência real situando-se necessariamente acima do limiar de detecção assegurado pelo delineamento adotado.

3. 3. 3 Distribuição fenotípica e gradiente de MSR

A distribuição dos valores de MSR individual na dose 2.160 g e.a. ha^{-1} revelou uma cauda superior discreta, correspondente às duas plantas resistentes da Família 27. Esse padrão é consistente com a teoria de caracteres de limiar de Falconer e Mackay (1996). Portanto a resistência funcional emerge como um evento de cauda na distribuição contínua de tolerância, e não como uma mudança na GR_{50}/GR_{80} da população.

Os valores de MSR individual variaram de < 1 % (plantas altamente suscetíveis) até 32,5 % (planta mais tolerante da Família 27), com a maioria das

plantas concentradas abaixo de 15 %, reforçando o caráter raro do fenótipo R* na população estudada.

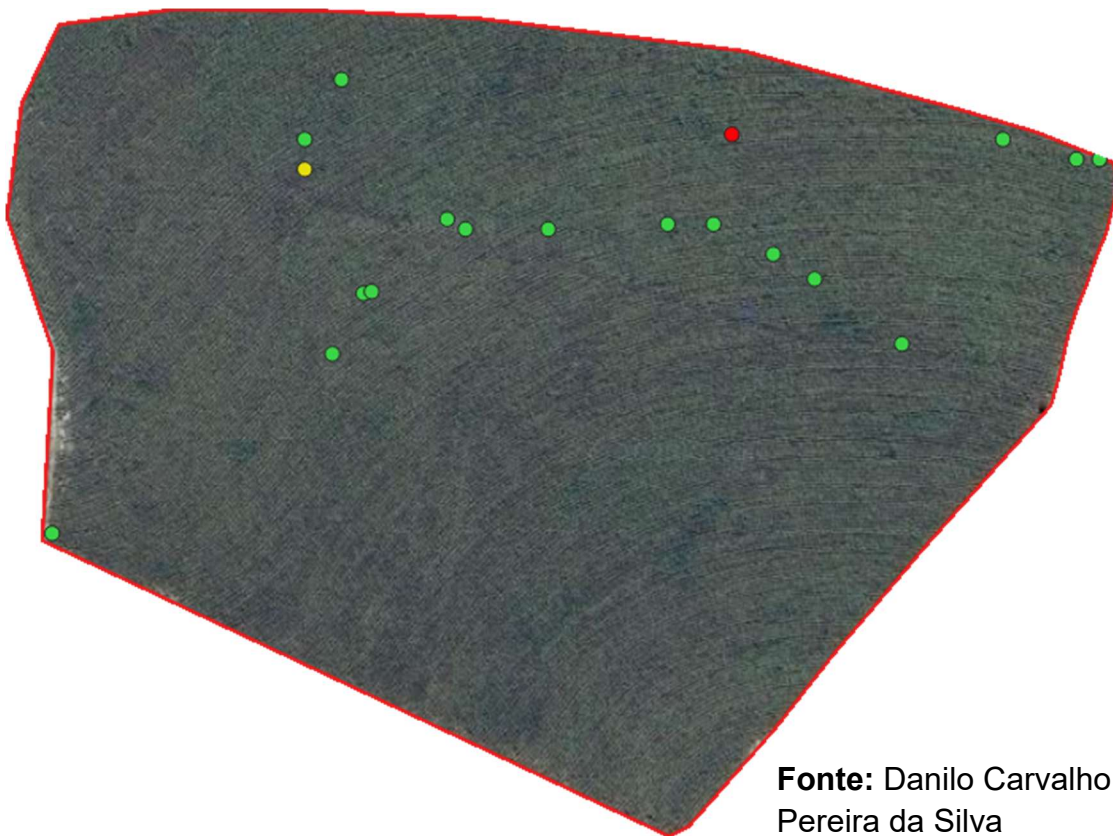
3. 3. 4 Mapa de risco fenotípico

Com base na classificação MSR e nos critérios R*/S, as 19 progênies foram distribuídas em três zonas de risco:

- Zona vermelha (R*): Família 27 — resistência funcional confirmada (2/4 plantas R*).
- Zona amarela (limiar): Família 38 — MSR máxima de 29,6 %; não classificada como R*, mas exige monitoramento.
- Zona verde (S): as demais 17 famílias — totalmente suscetíveis.

Este mapa de risco (Figura 1) permite priorizar estratégias de manejo diferenciadas por subpopulação, alinhado com abordagens de diagnóstico preditivo e precoce de resistência (Kreiner *et al.*, 2018; Neve, 2009).

Figura 1 - Mapa de Risco R*



Fonte: Danilo Carvalho
Pereira da Silva

3. 4 DISCUSSÃO

3. 4. 1 Confirmação da resistência ao nível populacional

A detecção da Família 27 em Estado Operacional de Resistência (R*) representa o achado central deste capítulo: a resistência funcional ao glifosato já está estabelecida na população de *Eleusine indica* estudada em Lençóis Paulista.

Em uma população onde 18 das 19 progênies avaliadas apresentaram biomassa relativa (*MSR*) abaixo de 10 %, a sobrevivência de duas plantas com *MSR* de 32,5 % e 32,3 % na dose de campo (2160 g e.a. ha⁻¹) indica que o limiar funcional de resistência foi efetivamente rompido, ainda que de forma localizada e com baixa ocorrência.

Eleusine indica figura entre as espécies com casos confirmados de resistência ao glifosato no mundo e o número de biótipos resistentes documentados no banco internacional vem crescendo de forma consistente (Heap, 2026). No Brasil, levantamentos recentes indicam que biótipos de *E. indica* com baixa suscetibilidade ao glifosato estão distribuídos em pelo menos cinco estados, com alguns casos envolvendo resistência múltipla a inibidores de ACCase (Oliveira Jr. *et al.*, 2025).

O presente resultado amplia esse panorama, ao demonstrar que a resistência pode ser detectada em estágio inicial, antes que a população como um todo mostre sinais visíveis de falha de controle no campo (Burgos *et al.*, 2013; Sammons; Gaines, 2014).

O método R*, ao adotar uma dose discriminatória fixa e um critério binário de classificação fenotípica individual, permitiu capturar dois indivíduos funcionalmente resistentes que seriam diluídos em qualquer análise de média populacional. Portanto a resistência funcional emerge como evento de cauda da distribuição fenotípica, e não como deslocamento de sua mediana.

3. 4. 2 O gradiente de MSR e a arquitetura genética subjacente

A distribuição dos valores individuais de *MSR* na dose discriminatória, variando de menos de 1 % nas progênies mais suscetíveis até 32,5 % na planta mais tolerante da Família 27, é muito mais informativa do que estatística de média.

Esse gradiente contínuo sugere que a tolerância ao glifosato, na população em questão, é um caráter de variação contínua subjacente que se expressa de forma discreta apenas quando um limiar fenotípico é cruzado. Essa estrutura é precisamente a que Falconer e Mackay (1996) descrevem como "caráter de limiar" (*threshold trait*): fenotipicamente binário (R*/S), mas geneticamente contínuo, controlado pelo acúmulo de múltiplos alelos de efeito menor.

Essa interpretação é consistente com a hipótese de resistência não relacionada ao sítio de ação (NTSR), de natureza poligênica. Busi *et al.* (2012) demonstraram em *Lolium rigidum* que a seleção recorrente com doses subletais é capaz de enriquecer, ao longo de gerações, um conjunto de genes aditivos de pequeno efeito, em que cada um contribui modestamente para a tolerância, mas cujo acúmulo culmina em fenótipos funcionalmente resistentes.

Da mesma forma, Gressel (2009) descreveu o fenômeno como *creeping resistance* (resistência gradual): diferentemente das mutações de sítio-alvo, que produzem mudanças abruptas na sobrevivência, a NTSR causa um deslocamento lento da média de tolerância de toda a população, tornando-a muito mais difícil de detectar precocemente pelos métodos convencionais.

Do ponto de vista mecanístico, os mecanismos NTSR mais frequentemente associados ao glifosato incluem aumento do metabolismo via citocromos P450, redução da absorção foliar e do transporte a longa distância, além de sequestro vacuolar do herbicida (Powles; Yu, 2010; Sammons; Gaines, 2014).

Yuan *et al.* (2007) enfatizam que esses mecanismos são controlados por famílias multigênicas (P450, glutathione-S-transferases, glicosiltransferases e transportadores ABC) cuja regulação coordenada pode ser selecionada gradualmente mesmo por doses de campo, especialmente em espécies com alta variação genética prévia (*standing genetic variation*). O gradiente de *MSR* observado pode ser compatível com esse cenário.

3. 4. 3 Frequência de R* e implicações evolutivas para o manejo

Com uma frequência pontual de 5,26 % (1/19 progênies) e um limite superior de 21,5 % pelo intervalo de confiança a 99 %, os dados indicam que a resistência funcional na população estudada se encontra em estágio inicial. Do ponto de vista do manejo, o que importa não é apenas a frequência atual, mas a trajetória evolutiva esperada sob continuação da pressão de seleção.

Preston e Powles (2002), ao avaliarem populações de *Lolium rigidum* nunca tratadas com inibidores da ALS, encontraram frequências iniciais de alelos resistentes da ordem de 10^{-5} a 10^{-4} , valores que, sob seleção continuada, permitiriam a manifestação de resistência em apenas três a quatro gerações de campo.

Neve e Powles (2005a, 2005b) demonstraram que a seleção recorrente com doses abaixo do recomendado eleva a razão R/S de forma exponencial ao longo de apenas um ciclo de seleção, com razões de 2,8 a 23,2 obtidas em uma única geração selecionada. Busi *et al.* (2012) expandiram esse achado ao mostrar que a resistência poligênica de base metabólica, uma vez enriquecida, pode conferir resistência cruzada a herbicidas de outros grupos de ação, tornando o problema consideravelmente mais difícil de reverter.

No contexto brasileiro, onde o glifosato representa mais de 70 % do volume total de herbicidas aplicados em culturas transgênicas, e onde *E. indica* já apresenta biótipos com múltiplos mecanismos de resistência documentados (Oliveira Jr. *et al.*, 2025; Heap; Duke, 2017), a detecção de um fenótipo R* funcional em uma população ainda pouco monitorada reforça a urgência de abordagens de vigilância preditiva.

Neve (2009) argumentou que o manejo de plantas daninhas deve incorporar o pensamento evolutivo, ou seja, não apenas reagir à resistência estabelecida, mas antecipar e interferir nos processos que a constroem. A modelagem de Neve (2011) para *Amaranthus palmeri* demonstrou que intervenções precoces, quando a frequência de alelos resistentes ainda é baixa e as populações ainda são demograficamente vulneráveis, têm impacto muito maior na taxa de evolução da resistência do que intervenções tardias, por mais intensas que sejam.

A implicação prática é direta: a detecção da Família 27 como R* deve sinalizar ao produtor e ao técnico a necessidade de diversificação de mecanismos de ação, rotação de herbicidas e implementação de práticas de manejo integrado que

interrompam o ciclo de seleção, antes que a frequência de R^* aumente a ponto de comprometer o controle da espécie.

Renton *et al.* (2014) enfatizam que a simulação computacional pode auxiliar na comparação de estratégias de manejo em diferentes cenários de pressão de seleção. Ferramenta que se torna relevante quando os dados de frequência inicial, como os obtidos aqui, estão disponíveis.

3. 4. 4 A Família 38 como zona de transição fenotípica

O caso da Família 38, merece atenção específica, pois representa um fenômeno fenotipicamente distinto tanto das famílias claramente suscetíveis quanto da Família 27.

Sob a perspectiva dos caracteres de limiar de Falconer e Mackay (1996), esse valor próximo ao limiar indica que a "responsividade" subjacente da Família 38 ao glifosato está próxima do valor crítico que separa os dois estados fenotípicos discretos. Em outras palavras, a Família 38 pode estar biologicamente a uma ou duas gerações de seleção de cruzar esse limiar (genótipo pré-resistente).

Gressel (2009) descreveu esse tipo de indivíduo como o motor inicial da *creeping resistance*: plantas que, individualmente, ainda não atingem o nível de tolerância necessário para ser classificadas como resistentes, mas que, ao cruzarem entre si (ou com os poucos indivíduos efetivamente R^*), produzem descendentes com acúmulo progressivo de alelos de menor efeito.

Busi *et al.* (2012) demonstraram que, mesmo sob uma única geração de seleção com dose subletal, a frequência de fenótipos tolerantes na progênie de plantas sobreviventes aumenta significativamente em relação à população original. Sob esse ponto de vista, a presença da Família 38 na zona amarela não é um ruído estatístico, mas um sinal biológico que merece ser tratado como evidência adicional de que a resistência está em processo de consolidação nessa população.

A questão de se a tolerância da Família 38 tem base genética hereditária ou reflete plasticidade fenotípica ambiental não pode ser resolvida com os dados do presente capítulo. Essa distinção será abordada diretamente no Capítulo 4, onde a estimação dos componentes de variância e da evolvabilidade por dose permitirá avaliar se há variância genética aditiva expressiva na faixa de biomassa correspondente à zona limite.

3. 4. 5 Limitações do estudo e perspectivas futuras

Todo diagnóstico fenotípico opera com restrições que precisam ser explicitadas para que suas conclusões sejam corretamente interpretadas. A primeira diz respeito ao tamanho amostral: com 19 progênies, o experimento detém 99 % de poder para detectar resistência se a frequência real na população for $\geq 21,5$ %. Para frequências menores o poder cai substancialmente, e a ausência de detecção não equivale à ausência de resistência.

Estudos de vigilância em escala regional, com amostras de 100 ou mais indivíduos por localidade, seriam necessários para estimar frequências de R^* da ordem de 1 a 3 % com 95 % de confiança, conforme demonstrado pelo modelo binomial (Ross, 2010).

A segunda limitação é geográfica: o presente estudo avalia uma única população de uma única localidade (Lençóis Paulista, SP). A resistência a herbicidas é um processo essencialmente espacial: a migração de pólen e sementes entre talhões, a movimentação de maquinário e os padrões de uso de herbicida em escala regional determinam, em grande parte, a taxa de dispersão dos alelos resistentes (Beckie *et al.*, 2019; Kreiner *et al.*, 2018).

Um biótico identificado como R^* em Lençóis Paulista pode ser a ponta de um evento de dispersão a partir de uma fonte de resistência mais estabelecida em outra região, ou pode representar um evento independente de evolução local. Sem dados de múltiplas populações georreferenciadas, essa questão permanece em aberto.

A terceira limitação refere-se à ausência de confirmação molecular do mecanismo de resistência. O critério R^* é deliberadamente agnóstico ao mecanismo: classifica o fenótipo integrado, independentemente de a tolerância derivar de mutação no gene EPSPS, de amplificação gênica ou de mecanismos NTSR (Powles; Yu, 2010; Sammons; Gaines, 2014).

Burgos *et al.* (2013) ressaltam que os testes moleculares baseados em DNA apenas detectam resistência por sítio-alvo, gerando falsos negativos quando o mecanismo é metabólico, exatamente o tipo de resistência que, pelos padrões de *MSR* observados (gradiente, não bimodalidade), parece mais provável nesta população. Estudos complementares de curvas dose respostas, sequenciamento do gene EPSPS, quantificação de sua expressão e ensaios enzimáticos com inibidores de

P450 seriam necessários para caracterizar definitivamente a resistência e o mecanismo com precisão.

Por fim, é importante considerar que o diagnóstico R* foi aqui realizado com glifosato. Kreiner *et al.* (2018) demonstraram que a resistência a um herbicida frequentemente co-evolui com tolerância a outros mecanismos de ação, especialmente quando os mesmos genes metabólicos envolvidos na detoxificação de um herbicida também atuam sobre outros. A extensão do protocolo R* para outros princípios ativos, como inibidores de ACCase (cletodim, haloxifop-methyl) e inibidores de ACCase, teria valor considerável, dado o histórico de resistência múltipla já documentado em *E. indica* no Brasil (Oliveira Jr. *et al.*, 2025).

3. 5 CONCLUSÃO

O objetivo central deste capítulo foi verificar se a resistência funcional ao glifosato já se encontra estabelecida em nível populacional em *Eleusine indica*, utilizando progênies maternas como unidades genéticas independentes e o Estado Operacional de Resistência (R*) como critério de classificação fenotípica.

Os resultados confirmaram essa hipótese, uma vez que a Família 27 foi classificada como R*, com duas plantas apresentando biomassa relativa superior ao limiar funcional de 30% após exposição à dose discriminatória de 2160 g e.a. ha⁻¹. Dessa forma, conclui-se que a resistência funcional ao glifosato já pode estar presente na população avaliada, ainda que em baixa frequência. Além disso, a abordagem baseada em progênies associada ao critério R* mostrou-se adequada para a detecção precoce da resistência em nível populacional.

REFERENCIAS

ALBRECHT, A. J. P.; BIFFE, D. F.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; ALBRECHT, L. P.; OLIVEIRA JR., R. S. (ed.). Capim-pé-de-galinha: fundamentos e recomendações para manejo. Botucatu: **FEPAF**, 2025. 131 p. ISBN 978-65-89571-19-3. DOI: 10.54236/9786589571193.

BECKIE, H. J.; ASHWORTH, M. B.; FLOWER, K. C. Herbicide resistance gene flow in weeds: under-estimated and under-appreciated. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 283, p. 106566, 2019.

BECKIE, H. J.; HEAP, I. M.; SMEDA, R. J.; HALL, L. M. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, v. 14, n. 2, p. 428–445, 2000.

BURGOS, N. R.; TRANEL, P. J.; STREIBIG, J. C.; DAVIS, V. M.; SHANER, D.; NORSWORTHY, J. K.; RITZ, C. Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 4–20, 2013.

BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 2, p. 231–242, 2012.

BUSI, R.; POWLES, S. B. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. **Heredity**, v. 103, n. 4, p. 318–325, 2009.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (ed.). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2. ed. Campinas: **HRAC-BR**, 2004. Cap. 1, p. 3–22.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (ed.). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3. ed. Piracicaba: **HRAC-BR**, 2009. Cap. 2, p. 35–55.

CROSSA, J.; VENCOVSKY, R. Basic sampling strategies: theory and practice. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; GOLDBERG, E. (ed.). Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines - 2011 Update. [S.l.]: **Bioversity International**, 2011.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. Introduction to quantitative genetics. 4. ed. Harlow: **Longman**, 1996. 464 p.

GRESSEL, J. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, v. 65, n. 11, p. 1164–1173, 2009. DOI: 10.1002/ps.1842.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Princípios de genética de populações. Tradução de Laura Roberta Pinto Utz *et al.* 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010. ISBN 978-85-363-2374-9. (Obra original: Principles of Population Genetics. 4. ed. Sunderland: **Sinauer Associates**, 2007).

HEAP, I.; DUKE, S. O. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1040–1049, 2018. DOI: 10.1002/ps.4760. (Manuscrito aceito em 2017, citado como HEAP, 2017 no texto).

HURLBERT, S. H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological Monographs**, v. 54, n. 2, p. 187–211, 1984.

JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, n. 2, p. 176–193, 1996.

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

NEVE, P.; NORSWORTHY, J. K.; SMITH, K. L.; ZELAYA, I. A. Modelling evolution and management of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Weed Research**, v. 51, n. 2, p. 99–112, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-3180.2010.00838.x.

NEVE, P.; POWLES, S. B. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. **Heredity**, v. 95, n. 6, p. 485–492, 2005a. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800751.

NEVE, P.; POWLES, S. B. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1154–1166, 2005b. DOI: 10.1007/s00122-005-1947-2.

NEVE, P.; VILA-AIUB, M.; ROUX, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 783–793, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03034.x.

OLIVEIRA JR., R. S.; WITTER, A. P. W.; FERREIRA, L. A. I.; GRANZIOLI, L.; BARION, J. H.; PASQUALOTO, S. P.; BIFFE, D. F.; CONSTANTIN, J. Monitoramento de resistência em biótipos de *Digitaria insularis* e *Eleusine indica* no Brasil. Informe Técnico **HRAC-BR**, v. 6, n. 1, 31 out. 2025. ISSN 2675-4150. Disponível em: www.hrac-br.org.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, p. 317–347, 2010. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119.

PRESTON, C.; POWLES, S. B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 88, n. 1, p. 8–13, 2002. DOI: 10.1038/sj/hdy/6800004.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: **R Foundation for Statistical Computing**, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RENTON, M.; BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Herbicide resistance modelling: past, present and future. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1394–1404, 2014.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, e0146021, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0146021.

ROSS, S. M. Introduction to probability models. 10. ed. Burlington: **Academic Press**, 2010. 784 p. ISBN 978-0-12-375686-2.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1367–1377, 2014. DOI: 10.1002/ps.3743.

SEEFELDT, S. S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v. 9, n. 2, p. 218–227, 1995. DOI: 10.1017/S0890037X00023253.

STREIBIG, J. C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v. 28, n. 6, p. 479–484, 1988.

VENCOVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. F. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: Recursos genéticos vegetais. Brasília: **EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007.

VENCILL, W. K.; NICHOLS, R. L.; WEBSTER, T. M.; SOTERES, J. K.; MALLORY-SMITH, C.; BURGOS, N. R.; JOHNSON, W. G.; McCLELLAND, M. R. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 60, n. esp. 1, p. 2–30, 2012. DOI: 10.1614/WS-D-11-00206.1.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART JR., C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 7–13, 2007. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.11.001.

CAPÍTULO 4

SUBDOSE BIOLÓGICA E POTENCIAL EVOLUTIVO EM PROGÊNIES DE *Eleusine indica* (L.) Gaertn SOB GLIFOSATO: UMA RELEITURA QUANTITATIVA DO CONCEITO DE SUBDOSE.

4. 1 INTRODUÇÃO

A resistência a herbicidas é, um processo evolutivo (Neve *et al.*, 2009; Powles; Yu, 2010; Délye *et al.*, 2013; Kreiner *et al.*, 2018; Murphy; Tranel, 2019). Como qualquer fenômeno adaptativo sob seleção, sua dinâmica é regida pela variação genética disponível na população, pela arquitetura genética subjacente ao caráter e pela pressão seletiva imposta pelo ambiente.

Em ciência das plantas daninhas, contudo, a operacionalização do conceito de resistência ainda consiste, majoritariamente, em diagnósticos qualitativos baseados em mortalidade ou em deslocamento de curvas dose-resposta entre populações suscetíveis e resistentes. Essa abordagem é eficaz quando a resistência é mediada por alelos de grande efeito e/ou já está fenotipicamente consolidada, mas perde sensibilidade quando o fenômeno é poligênico, gradual ou ainda incipiente (Délye, 2013; Yu & Powles, 2014; Comont *et al.*, 2020, 2022; Cai *et al.*, 2023). Em populações de campo expostas, a resposta ao herbicida raramente é binária; manifesta-se como gradiente contínuo de desempenho, no qual uma fração reduzida de indivíduos ou famílias pode reter biomassa sob doses que eliminam a maior parte da população.

Capturar essa fração (a cauda fenotípica da distribuição) é o requisito metodológico essencial para dizer se há estrutura genética subjacente. O capítulo anterior (Capítulo 3) demonstrou que essa cauda é subestimada quando a amostragem opera no nível do bulk populacional, e que a individualização de progênies maternas fornece resolução para detectá-la. Cabe agora à genética quantitativa o passo seguinte: quantificar, em escala proporcional, a magnitude do potencial evolutivo associado a essa cauda funcional.

Uma distinção conceitual é importante para a interpretação que se segue. A seleção natural não atua sobre a dose nominal aplicada por hectare; atua sobre o efeito biológico que essa dose exerce sobre cada indivíduo (Renton *et al.*, 2011). Esse efeito varia consideravelmente conforme estágio fenológico, condições ambientais durante e após a aplicação, qualidade de cobertura foliar e características fisiológicas

e genéticas do próprio indivíduo. Em consequência, uma dose pode ser agronomicamente alta — superior à recomendação de bula — e ainda assim biologicamente subletal para genótipos localizados na cauda superior de tolerância da população. Inversamente, uma dose nominalmente reduzida pode atuar de modo letal sobre genótipos de baixa tolerância. A categoria subdose, portanto, admite duas leituras conceitualmente distintas que precisam ser separadas com clareza: agronomicamente, é a dose abaixo da recomendação comercial; evolutivamente, é qualquer dose efetiva que não impede sobrevivência funcional e potencial contribuição reprodutiva de um indivíduo ou família.

Essa distinção dialoga com a literatura clássica de seleção em subdoses, e não a contesta. Neve; Powles (2005a,b) demonstraram que sobreviventes de aplicações reduzidas de diclofop-metil em *Lolium rigidum* podem ser conduzidos à reprodução e gerar progênie com GR_{50} deslocado em uma única geração de seleção. Busi; Powles (2009), trabalhando especificamente com glifosato na mesma espécie, mostraram que seleção recorrente em doses sub-letais durante três a quatro ciclos dobra o LD_{50} da população e eleva a sobrevivência à dose comercial recomendada para até 33%. Busi *et al.* (2013) confirmaram, por análise genética envolvendo cruzamentos F_1 , F_2 e back-cross, que esse fenótipo é controlado por aditividade-dominância em pelo menos três loci, configurando resistência poligênica de pequenos efeitos cumulativos a partir de variação permanente (standing genetic variation). Renton *et al.* (2011) sustentam, por modelagem individual-baseada, que reduzir doses tende a comprometer a sustentabilidade do sistema em arquiteturas poligênicas. O elemento causal comum nesses estudos não é, contudo, a baixa dose em si; é a permanência de sobreviventes capazes de contribuir geneticamente para a geração seguinte — isto é, a dose biologicamente subletal para o indivíduo selecionável.

A genética quantitativa contemporânea oferece o instrumento conceitual apropriado para mensurar essa variação selecionável. A herdabilidade no sentido restrito ($h^2 = \sigma_A^2 / \sigma_P^2$) tem sido amplamente utilizada como descritor do potencial evolutivo de caracteres quantitativos, mas a meta-análise abrangente de Hansen *et al.* (2011), baseada em 1.465 estimativas de variância genética compiladas de duas décadas de literatura em *Evolution* e *Journal of Evolutionary Biology*, demonstrou empiricamente que h^2 não é evolvabilidade: a correlação observada entre h^2 e a evolvabilidade média-padronizada I_A é estatisticamente próxima de zero ($R^2 = 1,3\%$

no conjunto global) (Houle, 1992). Mais relevante para o presente trabalho, h^2 é particularmente sensível à variância ambiental, podendo ser artificialmente elevada em condições experimentais que reduzam σ_P^2 . Esses autores concluem explicitamente que h^2 não deve ser utilizada como medida de potencial evolutivo em populações naturais, recomendando, em seu lugar, a evolvabilidade média-padronizada $I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$ sensu Houle (1992), que padroniza a variância aditiva pelo quadrado da média do caráter e expressa-se como a mudança proporcional esperada no caráter sob pressão seletiva unitária. Diferentemente de h^2 , I_A não incorpora diretamente a variância residual no denominador, o que reduz sua dependência da variância ambiental em comparação à herdabilidade; ainda assim, I_A não deve ser tratada como invariável ao ambiente, pois a própria expressão de σ_A^2 pode depender da condição experimental (Hoffmann; Merilä, 1999; Hansen *et al.*, 2011).

O arcabouço multivariado de Hansen; Houle (2008) estendeu essa formulação para matrizes completas de covariância genética e aplicou-a empiricamente à divergência morfológica entre espécies de *Drosophilidae*, demonstrando aplicabilidade em populações naturais ao longo de escalas evolutivas extensas. A transferência conceitual da métrica para sistemas agrícolas — onde a seleção opera em escalas menores, mas sob pressões parecidas com a da natureza — é, portanto, justificada e empiricamente respaldada (Hansen *et al.*, 2011; Houle *et al.*, 2017).

A pergunta que orienta este capítulo é, portanto, a seguinte: em uma população de *E. indica* oriunda de campo, com histórico provável de exposição ao glifosato, sob qual condição seletiva a população revela variação genética funcional capaz de sustentar resposta evolutiva, caso os sobreviventes contribuam reprodutivamente para a geração seguinte? A hipótese central é que o potencial evolutivo acessível, mensurado por I_A , não é uniformemente distribuído ao longo do gradiente de doses: existe uma condição em que a seleção é intensa o suficiente para eliminar a maioria dos indivíduos suscetíveis, mas ainda biologicamente subletal para famílias localizadas na cauda superior da distribuição de tolerância. Nessa condição, espera-se observar simultaneamente: (i) presença do fenótipo R^* operacionalmente definido (Capítulo 3); (ii) efeito significativo de progênie na ANOVA particionada da variância; e (iii) máximo local de I_A no gradiente de doses. A convergência dessas três assinaturas em uma mesma dose constituiria evidência de que aquela condição opera, biologicamente, como subdose para a fração selecionável da população.

4. 2 MATERIAL E METODOS

4. 2. 1 Material vegetal e desenho experimental

Sementes maternas de *E. indica* foram coletadas em área de reforma de cana de açúcar sob histórico de uso recorrente de glifosato em Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil. Plantas maternas foram identificadas e amostradas individualmente, e suas sementes mantidas separadas para preservar a identidade de progênie. Dezenove progênies maternas de polinização aberta foram selecionadas para o bioensaio dose-resposta. Procedimentos de germinação, transplântio e condições gerais de cultivo seguiram o detalhamento apresentado nos Capítulos 2 e 3.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 19×7 (progênies $\times$ doses), com quatro repetições por combinação, totalizando 532 unidades experimentais úteis. Cada unidade consistiu em um vaso individual contendo uma planta no estágio fenológico BBCH-22 (Hess *et al.*, 1997). A disposição espacial das unidades foi aleatorizada entre bancadas, conforme as recomendações clássicas sobre pseudo-replicação (Hurlbert, 1984). As doses de glifosato testadas foram: 0 (testemunha sem aplicação), 67,5; 270; 540; 1.080; 2.160; e 4.320 g e.a. ha⁻¹. A variável-resposta foi a biomassa seca da parte aérea, avaliada aos 35 dias após a aplicação. A biomassa seca relativa (MSR) de cada indivíduo foi calculada como a razão entre a sua biomassa seca observada e a média de biomassa seca das plantas da mesma progênie na testemunha sem aplicação.

4. 2. 2 Cálculo da Biomassa Seca Relativa (MSR) e Média por Dose

Cálculo da biomassa seca relativa e média por dose. A variável-resposta foi a biomassa seca da parte aérea, avaliada aos 35 dias após a aplicação. A biomassa seca relativa (MSR) de cada planta tratada foi calculada como a razão entre a sua biomassa seca observada e a média de biomassa seca das plantas testemunha da respectiva progênie materna — ou seja, cada indivíduo tratado foi normalizado pelo desempenho basal da própria família. Essa normalização intra-progênie preserva diferenças intrínsecas de vigor entre famílias maternas, evitando que heterogeneidade não associada à resposta ao herbicida contamine a estimativa de variância entre

progênies (σ_{ENTRE}^2) nas doses tratadas. Para cada dose d de glifosato, a média populacional de MSR foi obtida pela média aritmética das 76 observações individuais correspondentes às 19 progênies maternas $\times$ 4 repetições:

$$\mu = \frac{1}{76} \sum_{i=1}^{19} \sum_{j=1}^4 MSR_{ijd}$$

em que μ representa a média de MSR na dose d , i indexa a progênie materna e j a repetição individual dentro de cada progênie. Como o desenho é balanceado (4 repetições por progênie em todas as doses tratadas), essa média individual é numericamente equivalente à média das 19 médias de progênie.

4. 2. 3 Componentes de Variância e Evolvabilidade

Para cada dose não-nula, conduziu-se análise de variância (ANOVA) one-way com a progênie como fator. Os componentes de variância foram estimados a partir dos quadrados médios (MS) do modelo:

$$\sigma_{ENTRE}^2 = \max \left(\frac{MSB - MSW}{k}, 0 \right)$$

onde k é o número de repetições por progênie ($k = 4$); e $\sigma_{DENTRO}^2 = MSW$. Estimativas negativas do componente entre progênies foram truncadas a zero, conforme convenção amplamente adotada (Hoffmann; Merilä, 1999). Cabe enfatizar que essa convenção é uma decisão metodológica, e não implica que a variância biológica real seja necessariamente nula nas doses correspondentes; significa apenas que, sob o desenho amostral adotado, o sinal de variância entre progênies não é estatisticamente distinguível do ruído residual.

A variância aditiva foi estimada por:

$$\sigma_A^2 = (m \times \sigma_{ENTRE}^2)$$

onde m é o multiplicador de parentesco. *E. indica* é uma espécie predominantemente autógama (Albrecht *et al.*, 2025); portanto, o pressuposto clássico de famílias de meios-irmãos ($m = 4$), apropriado para espécies de polinização aberta, representa um limite superior para a estimativa. Por essa razão, as estimativas foram apresentadas sob três cenários paralelos (análise de sensibilidade, ver adiante): $m =$

4 (meios-irmãos), $m = 2$ (irmãos completos) e $m = 1$ (linhagens selfed, limite inferior) (Falconer; Mackay, 1996).

A variância fenotípica total (σ_P^2) foi obtida pela soma dos componentes de variância:

$$\sigma_P^2 = \sigma_{ENTRE}^2 + \sigma_{DENTRO}^2$$

A herdabilidade no sentido restrito foi calculada como:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{(\sigma_{ENTRE}^2 + \sigma_{DENTRO}^2)}$$

O coeficiente de variação aditiva ($CV_A(\%)$), foi calculado, conforme proposto na métrica de Houle (1992):

$$CV_A = 100 \times \frac{\sqrt{\sigma_A^2}}{\mu}$$

onde μ é a média de MSR da dose correspondente.

A evolvabilidade média-padronizada foi calculada como (Houle, 1992; Hansen *et al.*, 2011):

$$I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$$

A interpretação adotada para I_A é a de potencial evolutivo acessível — isto é, a magnitude proporcional da resposta esperada sob pressão seletiva unitária —, e não a de evolução realizada nem de taxa evolutiva absoluta (Hansen & Houle, 2008). Intervalos de confiança 95% para I_A foram obtidos por bootstrap não-paramétrico (2.000 iterações), com reamostragem ao nível da progênie para preservar a estrutura hierárquica do delineamento (Efron; Tibshirani, 1993).

4. 2. 4 Enquadramento Funcional da Dose e do Limiar R^*

A interpretação dos resultados foi baseada na distinção entre dose nominal e dose biologicamente efetiva descrita na Introdução. Operacionalmente, neste estudo, a subdose biológica foi operacionalizada como subletalidade funcional estimada por biomassa residual acima do limiar R^* . Essa métrica indica potencial de recuperação e contribuição reprodutiva, mas não substitui a validação direta de produção de sementes viáveis em campo.

O limiar funcional adotado para o Estado Operacional de Resistência (R^*) foi $\theta = 0,30$, correspondente à manutenção de pelo menos 30% da biomassa relativa

em relação à testemunha da família. A escolha desse valor não foi arbitrária: está ancorada empiricamente nos resultados do Capítulo 2, em que a divergência entre os métodos de amostragem *bulk* e progênes tornou-se sistemática a partir da região do GR_{70} (dose causadora de 70% de redução de biomassa). R^* é definido operacionalmente como o estado funcional de indivíduos ou progênes capazes de manter $MSR \geq \theta$ sob dose discriminatória. O fato de esse limiar coincidir com a região em que o bulk passa a subestimar a heterogeneidade reforça sua utilidade diagnóstica, mas não constitui sua definição primária (a definição primária é o limiar funcional de biomassa). Essa interpretação conecta os Capítulos 2, 3 e 4 sob uma única lógica quantitativa, ancorada em propriedade empírica do gradiente dose-resposta.

A dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ foi adotada como dose discriminatória operacional. Sua escolha possui ancoragem externa — utilização em monitoramento nacional recente de biótipos brasileiros de *E. indica* (Oliveira Jr. *et al.*, 2025) por corresponder, no presente estudo, à condição em que três os pressupostos convergem: presença do fenótipo R^* , efeito significativo de progênie e máximo local de I_A .

Sob essa estrutura, uma dose é classificada como biologicamente subletal para um indivíduo ou família se, sob essa dose, o critério R^* ($MSR \geq \theta$) é satisfeito. Essa definição transforma um conceito em propriedade empiricamente testável, antes que a seleção em campo opere: a subletalidade biológica torna-se identificável por ensaio de progênes, independentemente da subsequente comprovação de sucesso reprodutivo.

4. 2. 5 Análises de sensibilidade

Três análises de sensibilidade foram conduzidas para avaliar a robustez do achado central.

4. 2. 5. 1 Sensibilidade ao multiplicador de parentesco.

Apresentaram-se as estimativas de σ_A^2 , h^2 , $CV_A(\%)$ e I_A sob os três cenários de parentesco ($m = 4, 2, 1$).

4. 2. 5. 2 Sensibilidade à inclusão da Família 27.

A Família 27 foi a única classificada como R^* na dose 2.160 g e.a. ha^{-1} sob $\theta = 0,30$ (Capítulo 3). Para avaliar se o pico de I_A nessa dose reflete variação distribuída na população ou um evento concentrado nessa progênie, recalcularam-se os componentes de variância e I_A excluindo a F27 do conjunto de dados ($n = 18$ progênies, 72 unidades experimentais).

4. 2. 5. 3 Sensibilidade ao limiar funcional θ

A classificação R^* foi recalculada para cinco valores do limiar: $\theta = 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; e 0,40$.

Para cada valor de θ , registraram-se as progênies maternas classificadas como R^* (definidas como progênies contendo pelo menos um indivíduo com $MSR \geq \theta$ na dose 2.160), a frequência de progênies R^* estimada na população e o intervalo de confiança 99% binomial (Clopper-Pearson, 1934). Esses valores representam prevalência entre progênies maternas, não prevalência individual absoluta na população de campo.

4. 2. 6 Contextualização frente à literatura mundial

Os valores observados de I_A foram contextualizados frente à meta-análise de Hansen *et al.* (2011), (Tabela 1), que reporta medianas de I_A para diferentes categorias de traços biológicos. A correlação log-log de 0,77 entre I_A e a variância residual padronizada (I_E) reportada nessa mesma meta-análise sustenta o uso de I_A como métrica robusta a variações ambientais, justificando a aplicação da métrica mesmo em condições controladas de casa de vegetação.

4. 2. 7 Análises Estatísticas

Todas as análises foram conduzidas em ambiente R (R Core Team 2024), utilizando funções do pacote base stats e rotinas customizadas de reamostragem. As ANOVAs *one-way* foram ajustadas por meio da função aov, considerando progênie

como fator em cada dose não-nula, e os quadrados médios foram extraídos das tabelas de ANOVA para estimativa dos componentes de variância. Os bootstraps foram implementados por reamostragem hierárquica ao nível da progênie, com 2.000 iterações, preservando a estrutura do delineamento experimental. Os intervalos de confiança de I_A foram calculados pelo método percentílico, a partir da distribuição empírica das estimativas bootstrap. Os intervalos de confiança binomiais exatos para a frequência de progênies R^* foram calculados pelo método de Clopper-Pearson (1934), utilizando a função `binom.test` do pacote `stats`.

4. 3 RESULTADOS

4. 3. 1 Resposta média da biomassa ao longo do gradiente

A média de MSR caiu de 1,0 na testemunha para 0,640 a 67,5 g e.a. ha^{-1} , 0,367 a 270 g, 0,242 a 540 g, 0,163 a 1.080 g, e estabilizou-se em torno de 0,084–0,088 a 2.160 e 4.320 g e.a. ha^{-1} (Tabela 1; Figura 4.1). A redução foi monotônica e progressiva até 2.160 g, com aparente saturação na dose seguinte. Tal saturação da média não foi acompanhada por preservação da variância entre progênies.

4. 3. 2 Estrutura da variância genética e evolvabilidade

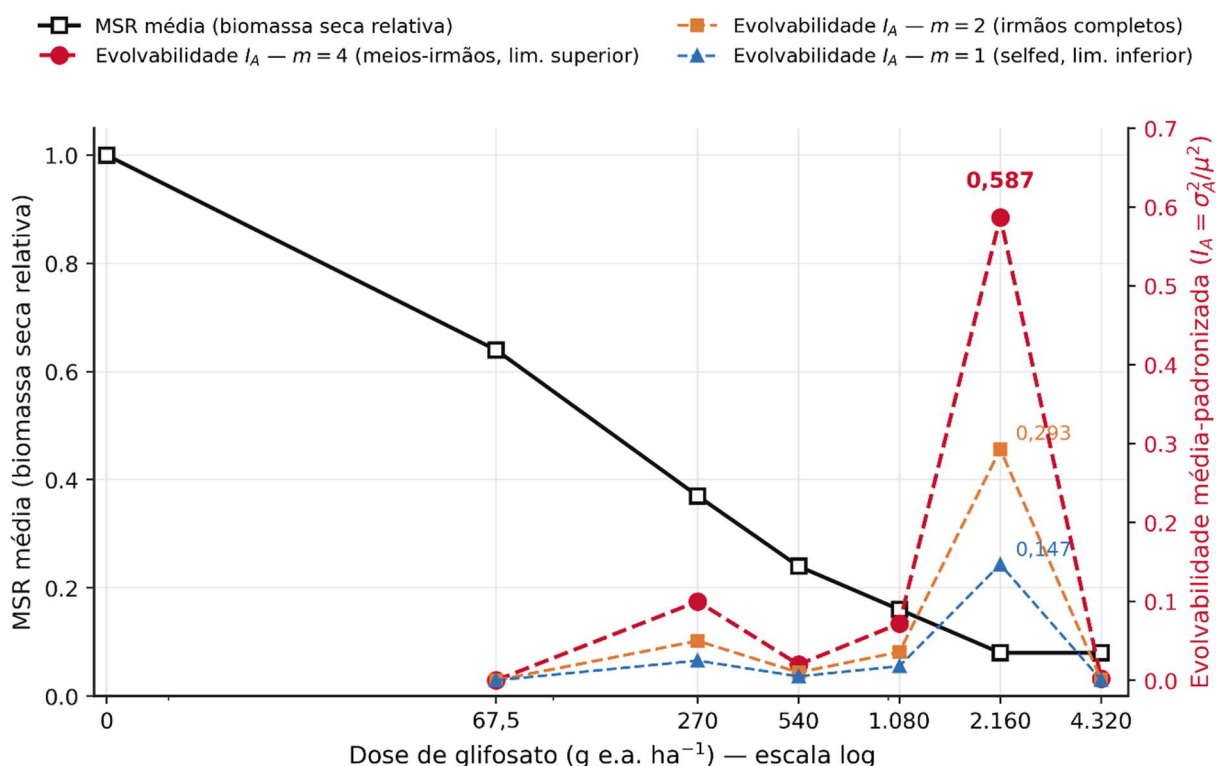
A ANOVA particionada por dose revelou efeito significativo de progênie apenas na dose de 2.160 g e.a. ha^{-1} ($F = 1,92$; $p = 0,033$; Tabela 1). Uma significância marginal foi observada também a 270 g e.a. ha^{-1} ($F = 1,77$; $p = 0,053$), e os demais valores de p foram superiores a 0,10. Sob a interpretação metodológica adotada, esses resultados indicam que a variação é estatisticamente confirmada sob o desenho experimental empregado na dose discriminatória, embora sinais positivos e marginalmente detectáveis tenham sido observados em doses intermediárias. Isso não implica ausência biológica absoluta de variação genética nas demais doses (Hoffmann; Merilä, 1999).

Na dose de 2.160 g e.a. ha^{-1} , sob o cenário de meios-irmãos ($m = 4$), as estimativas foram $h^2 = 0,478$, $CV_A(\%) = 76,6\%$ e $I_A = 0,587$ (Tabela 2). O

intervalo de confiança 95% por bootstrap foi de 0,109 a 1,410 para I_A . Na dose imediatamente superior, 4.320 g e.a. ha^{-1} , a média de MSR permaneceu próxima à observada em 2.160 (0,084 versus 0,088), mas σ_{Entre}^2 colapsou para zero e, consequentemente, I_A para zero (Tabela 1, Figura 1). Esse contraste entre médias semelhantes e estruturas de variância diametralmente opostas em duas doses contíguas é um dos resultados mais informativos do gradiente.

Adicionalmente, embora a confirmação estatística do efeito de progênie tenha sido restrita a 2.160 g e.a. ha^{-1} , o cálculo direto de I_A a partir dos componentes de variância da Tabela 1 revela um gradiente subjacente em todo o espectro de doses (Tabela 6; Figura 1). Esses valores devem ser lidos como estimativas pontuais com incerteza nas doses em que a ANOVA não confirmou estatisticamente a variação entre progênes, mas oferecem visão integrada do gradiente e evitam a impressão de que o pico em 2.160 seria um achado isolado de uma única dose.

Figura 1 - Relação entre o gradiente de dose de glifosato, a biomassa seca relativa média (MSR) e a evolvabilidade média-padronizada (I_A) em *Eleusine indica*.



A linha preta representa a MSR média, expressa como biomassa seca relativa ao controle sem herbicida. As linhas coloridas representam a evolvabilidade média-padronizada ($I_A = \frac{\sigma_A^2}{\mu^2}$) estimada sob três cenários de parentesco: $m = 1$, autofecundação, limite inferior; $m = 2$, irmãos completos; e $m = 4$, meios-irmãos, limite superior. O eixo da dose de glifosato está apresentado em escala logarítmica, com o tratamento controle indicado em 0 g e.a. ha⁻¹. Os valores anotados em 2.160 g e.a. ha⁻¹ destacam o pico de evolvabilidade estimado nessa dose, coincidente com forte redução da biomassa média.

Tabela 1 - Médias de biomassa seca relativa (MSR), estatísticas da ANOVA one-way com efeito de progênie e componentes de variância por dose de glifosato em 19 progênies maternas de *E. indica*.

Dose (g e.a. ha ⁻¹)	<i>n</i>	μ (MSR)	<i>F</i>	<i>p</i> -Valor	MSB	MSW	σ_{ENRE}^2
67,5	76	0,640	0,74	0,759	0,0766	0,1039	0 (trunc.)
270	76	0,367	1,77	0,053	0,0309	0,0175	0,0034
540	76	0,242	1,07	0,405	0,0197	0,0184	0,0003
1.080	76	0,163	1,11	0,370	0,0221	0,0200	0,0005
2.160	76	0,088	1,92	0,033*	0,0095	0,0050	0,0011
4.320	76	0,084	0,99	0,480	0,0034	0,0034	0 (trunc.)

n = número total de plantas avaliadas naquela dose; MSR = biomassa seca relativa; MSB = quadrado médio entre progênies; MSW = quadrado médio dentro de progênies/residual; σ_{ENTRE}^2 = componente de variância entre progênies. Estimativas negativas de σ_{Entre}^2 foram truncadas a zero. *Significativo a 5%; **significativo a 1%.

4. 3. 3 Sensibilidade ao multiplicador de parentesco

O desenho do gradiente é preservado integralmente sob os três cenários de parentesco, dado que o multiplicador *m* opera proporcionalmente sobre todas as estimativas (Tabela 2; Figura 1). O valor absoluto de I_A varia em fator quatro entre os

extremos (0,147 a 0,587), mas a forma do gradiente é a mesma. Mesmo no cenário mais conservador compatível com a biologia autógama de *E. indica* ($m = 1$; selfed extremo), $I_A = 0,147$ permanece alta em escala absoluta.

Tabela 2 - Estimativas de σ_A^2 , h^2 , $CV_A(\%)$ e I_A na dose 2.160 g e.a. ha⁻¹ sob três pressupostos de parentesco entre progênies. Como m opera proporcionalmente sobre σ_{ENTRE}^2 , σ_A^2 , e I_A escalam linearmente com m , e o mesmo se aplica aos limites do intervalo bootstrap.

Cenário	m	σ_A^2	h^2	$CV_A(\%)$	I_A	IC 95% I_A
Meios-irmãos (limite superior)	4	0,00454	0,478	76,6	0,587	[0,109; 1,410]
Irmãos completos	2	0,00227	0,314	54,2	0,293	[0,054; 0,705]
Selfed extremo (limite inferior)	1	0,00114	0,186	38,3	0,147	[0,027; 0,353]

Nota: os limites do IC 95% bootstrap para $m = 2$ e $m = 4$ foram derivados por reescalonamento proporcional dos limites obtidos sob $m = 1$, mantendo coerência com a relação $\sigma_A^2 = (m \times \sigma_{ENTRE}^2)$.

4. 3. 4 Sensibilidade à inclusão da Família 27

A exclusão da Família 27 do conjunto de dados na dose 2.160 g e.a. ha⁻¹ reduziu o sinal estatístico do efeito de progênie ($F = 1,60$; $p = 0,098$), mas não o eliminou (Tabela 3). Mais importante, as estimativas de I_A permaneceram substanciais em todos os cenários de parentesco: $I_A = 0,366$ sob $m = 4$ (sem F27) versus 0,587 com F27; $I_A = 0,092$ sob $m = 1$ (sem F27) versus 0,147 com F27. O intervalo de confiança 95% por bootstrap sem F27 incluiu zero como limite inferior, o que reflete o aumento de incerteza quando se reduz n para 18 progênies, mas o limite superior permaneceu elevado.

Tabela 3 - Estimativas de I_A na dose 2.160 g e.a. ha⁻¹ com e sem a Família 27.

Configuração	N progênes	F	p	I_A ($m = 1$)	I_A ($m = 2$)	I_A ($m = 4$)
Completo	19	1,92	0,033*	0,147	0,293	0,587
Sem F27	18	1,60	0,098	0,092	1,83	0,366
Razão (sem/com)	—	—	—	0,62	0,62	0,62

*Significativo a 5%; **significativo a 1%.

A interpretação evolutiva desse resultado é que o pico de I_A na dose 2.160 não é exclusivamente da Família 27. A F27 contribui de forma desproporcional ao sinal; mantendo, sozinha, aproximadamente 38% do valor de I_A do conjunto; mas a variação remanescente, distribuída entre as outras 18 progênes, ainda configura potencial evolutivo. Esse padrão corresponde à expectativa de que, em populações de campo já submetidas a histórico de seleção, a variação distribui como uma cauda longa, com a Família 27 representando o extremo mais visível, mas não o único contribuinte.

4. 3. 5 Sensibilidade ao limiar funcional θ

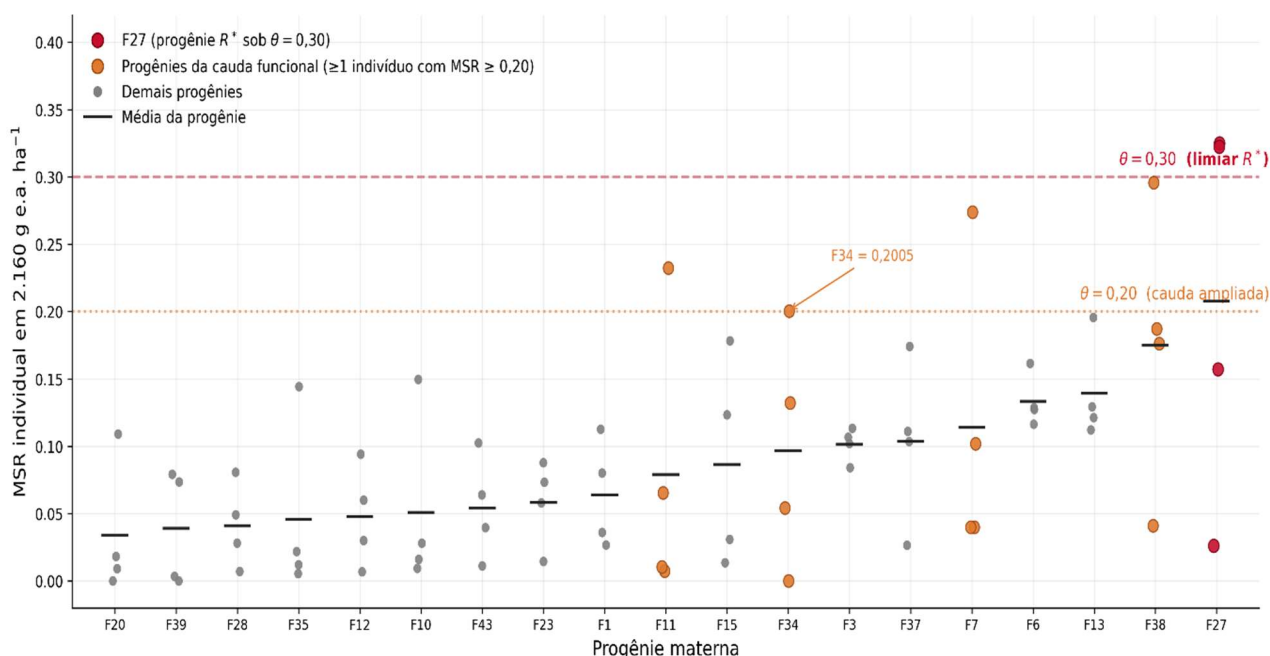
A análise de sensibilidade ao limiar revelou que a cauda funcional da população é mais ampla do que aquela capturada pelo critério estrito $\theta = 0,30$.

Sob $\theta = 0,30$, apenas a Família 27 é classificada como R^* (frequência de progênes $R^* = 5,26\%$; $IC\ 99\% = 0,03 - 33,11\%$). Sob $\theta = 0,25$, três famílias (7, 27 e 38) atendem ao critério ($15,79\%$; $IC\ 99\% = 1,86 - 46,82\%$). Sob $\theta = 0,20$, cinco famílias (7, 11, 27, 34 e 38) o atendem ($26,32\%$; $IC\ 99\% = 6,17 - 58,18\%$). Sob $\theta = 0,35$ ou $\theta = 0,40$, nenhuma família é classificada como R^* (Tabela 4; Figura 3). Esses valores representam prevalência entre progênes maternas, não prevalência individual absoluta na população de campo.

Tabela 4 - Sensibilidade da classificação R^* ao limiar funcional θ na dose 2.160 g e.a. ha^{-1} (n = 19 progêneses maternas).

θ	Progêneses R^*	k	Frequência de progêneses R^* (%)	IC 99% binomial (%)
0,20	7,11,27,34,38	5	26,32	6,17 – 58,18
0,25	7,27,38	3	15,79	1,86 – 46,82
0,30	27	1	5,26	0,03 – 33,11
0,35	—	0	0,0	0,00 – 21,52
0,40	—	0	0,0	0,00 – 21,52

Figura 2 - Distribuição individual da biomassa seca relativa (MSR) por progênie materna de *Eleusine indica* na dose de 2.160 g e.a. ha^{-1} de glifosato.



Cada ponto representa um indivíduo, e os traços horizontais indicam a média da progênie. A linha tracejada indica o limiar R^* adotado ($\theta = 0,30$) e a linha pontilhada indica a cauda funcional ampliada ($\theta = 0,20$). A F27 foi classificada como R^* , enquanto F7, F11, F34 e F38 apresentaram indivíduos na cauda funcional.

A Família 38, com MSR máxima de 0,2958 (29,58%), está imediatamente abaixo do limiar $\theta = 0,30$ — situação consistente com a observação feita no Capítulo 3 sobre sua posição na ‘zona amarela’ do mapa de risco fenotípico. As famílias 7 e 11, com MSR máximas próximas de 0,23 a 0,27, configuram-se como progêneses de tolerância intermediária. Esse achado refina a interpretação do Capítulo 3: a fração R^*

observada sob $\theta = 0,30$ captura apenas o pico da distribuição de tolerância, enquanto progênies adicionais com perfil intermediário existem na população e poderiam, sob seleção recorrente, ascender ao status R^* .

4. 3. 6 Contextualização frente à literatura mundial

A magnitude dos valores de I_A observados merece contextualização sistemática frente à literatura quantitativa contemporânea. Hansen *et al.* (2011) compilaram 1.465 estimativas de I_A obtidas em 157 estudos publicados em duas das principais revistas de biologia evolutiva entre 1992 e 2009, distribuídas em nove categorias de traços biológicos. As medianas reportadas naquela meta-análise variam entre 0,0009 (traços de tamanho linear) e 0,019 (traços comportamentais), com mediana global de 0,003 e mediana para traços de história de vida (categoria conceitualmente mais próxima à sobrevivência sob estresse herbicida) de 0,0095 (Tabela 5).

Os valores observados no presente estudo, sob qualquer cenário de parentesco e mesmo após exclusão da Família 27, excedem essas medianas. Contudo, essa magnitude absoluta deve ser interpretada com cautela: a média do caráter (MSR) sob 2.160 g e.a. ha⁻¹ é baixa ($\mu = 0,088$), e o escalonamento por μ^2 na fórmula de I_A amplifica diferenças proporcionais quando o denominador é pequeno. O contraste com a dose contígua de 4.320 g e.a. ha⁻¹; onde μ é semelhante (0,084) mas I_A colapsa para zero por ausência de σ_{ENTRE}^2 ; indica, entretanto, que o pico em 2.160 não resulta apenas de inflação pelo denominador: depende da persistência de variância entre progênies sob essa condição. A interpretação correta é de potencial evolutivo proporcional à média baixa que caracteriza a sobrevivência sob dose discriminatória.

Sob o cenário mais conservador ($m = 1$, sem F27), $I_A = 0,147$ — aproximadamente 39 vezes a mediana global e 15,47 vezes a mediana de traços de história de vida. Sob o cenário central ($m = 4$, com F27), $I_A = 0,587$ — aproximadamente 196 vezes a mediana global e 62 vezes a mediana de traços de história de vida.

Tabela 5 - Comparação dos valores de I_A obtidos neste estudo (dose 2.160 g e.a.ha⁻¹) com medianas reportadas por Hansen *et al.* (2011).

Fonte	$^1I_{A\text{ Obs}}$	Razão ($I_{A\text{ Obs}}/I_A$) ²
Hansen <i>et al.</i> (2011) — mediana global	0,003	—
Hansen <i>et al.</i> (2011) — tamanho linear	0,0009	—
Hansen <i>et al.</i> (2011) — história de vida	0,0095	—
Hansen <i>et al.</i> (2011) — comportamental	0,019	—
<i>E. indica</i> , 2.160 g e.a. ha ⁻¹ , m = 1 (selfed)	0,147	49 x
<i>E. indica</i> , 2.160 g e.a. ha ⁻¹ , m = 2 (irmãos completos)	0,293	98 x
<i>E. indica</i> , 2.160 g e.a. ha ⁻¹ , m = 4 (meios-irmãos)	0,587	196 x
<i>E. indica</i> , sem F27, m = 1	0,092	31 x
<i>E. indica</i> , sem F27, m = 4	0,366	122 x

¹ I_A Observada; ²Razão calculada em relação à mediana global de Hansen *et al.* (2011).

Tabela 6 - Estimativas pontuais de I_A por dose (sob $m = 4$) e correspondente p – valor da ANOVA particionada. A coluna de interpretação utiliza a convenção: confirmado ($p \leq 0,05$), marginal ($0,05 < p \leq 0,10$), não confirmado ($p > 0,10$).

Dose (g e.a. ha ⁻¹)	μ (MSR)	σ^2_{ENTRE}	I_A ($M = 4$)	p ANOVA	Interpretação
67,5	0,640	0 (trunc.)	0,000	0,759	Não confirmado
270	0,367	0,0034	0,101	0,053	Marginal
540	0,242	0,0003	0,020	0,405	Não confirmado
1.080	0,163	0,0005	0,075	0,370	Não confirmado
2.160	0,088	0,0011	0,587	0,033	Confirmado
4.320	0,084	0 (trunc.)	0,000	0,480	Não confirmado

Esse contraste é um achado de impacto evolutivo: populações de *E. indica* expostas a histórico de seleção por glifosato podem expressar, sob condições seletivas, um potencial evolutivo substancialmente acima do típico de traços biológicos clássicos. Tal expressão de potencial parece refletir a combinação de uma

população já estruturada por seleção prévia e um delineamento amostral capaz de revelar a cauda funcional acumulada.

4. 4 DISCUSSÃO

4. 4. 1 Evolvabilidade como potencial evolutivo acessível

Os resultados deste capítulo evidenciam que a resposta de *E. indica* ao glifosato não pode ser descrita apenas por médias populacionais ao longo do gradiente dose-resposta. A redução da biomassa confirma o efeito esperado do herbicida, mas a informação evolutivamente mais relevante reside na estrutura da variância entre progênies sob diferentes níveis de pressão seletiva. Essa distinção entre média e variância não é nova em genética quantitativa (Falconer; Mackay, 1996), mas tem sido subaproveitada em estudos aplicados de resistência a herbicidas, nos quais o foco analítico costuma recair sobre o deslocamento da curva dose-resposta média.

A evolvabilidade média-padronizada I_A foi adotada neste capítulo como estimativa do potencial evolutivo acessível; isto é, da quantidade de variação genética proporcional disponível para responder a seleção sob a condição testada. É essencial não confundir esta medida com taxa evolutiva realizada nem com velocidade de adaptação em campo. Como destacado por Hansen; Houle (2008), I_A captura, em uma única geração de bioensaio, se ainda existe estrutura genética entre progênies que possa sustentar resposta evolutiva caso os indivíduos sobreviventes contribuam para a geração seguinte. Trata-se de uma medida de capacidade proporcional condicional à pressão seletiva, e *responsability* (magnitude da resposta vetorial) é uma quantidade distinta, separada formalmente naqueles autores. Aplicar essa distinção ao presente estudo: o pico de I_A em 2.160 g e.a. ha⁻¹ não significa que essa dose, aplicada em campo, necessariamente acelerará a resistência. Significa que, na população avaliada e sob o desenho experimental empregado, essa foi a condição na qual a variação selecionável para retenção de biomassa tornou-se mais evidente.

A escolha de I_A em vez de h^2 como métrica principal do estudo merece justificativa, dada a tradição agrônômica do uso de h^2 . A meta-análise de Hansen *et al.* (2011) demonstrou, com base em 1.465 estimativas, que h^2 e I_A são

estatisticamente descorrelacionadas ($R^2 \approx 1,3\%$), e que h^2 é particularmente sensível à variância ambiental — podendo ser artificialmente elevada em ambientes que reduzam σ_P^2 . Esses autores recomendam que h^2 não seja usada como medida de potencial evolutivo em populações naturais. A correlação log-log de 0,77 entre I_A e I_E observada naquela mesma meta-análise sustenta o argumento de que ambientes controlados, como o de casa de vegetação utilizado aqui, podem inflar tanto σ_A^2 quanto σ_P^2 , mantendo a razão $I_A = \sigma_A^2/\mu^2$ em valores comparativamente a variações entre ambientes. Isso não implica que I_A seja invariável ao ambiente — σ_A^2 pode genuinamente diferir entre condições — mas implica que I_A é métrica mais transferível e mais comparável à literatura mundial do que h^2 .

A elevada herdabilidade observada na dose 2.160 g e.a. ha⁻¹ ($h^2 = 0,478$ sob $m = 4$) deve ser interpretada com cautela: provavelmente reflete, em parte, a homogeneização ambiental característica de casa de vegetação. Em condições de campo, com maior σ_P^2 , proveniente de heterogeneidade espacial, competição e variabilidade climática, h^2 real será provavelmente menor. A inferência via I_A é, por construção, menos sensível a esse viés, embora não imune a ele.

4. 4. 2 Dose Nominal, Dose efetiva e Subdose Biológica

A interpretação convencional de subdose em ciência das plantas daninhas é estritamente agrônômica: dose abaixo da recomendação de bula (Neve; Powles, 2005a,b; Busi; Powles, 2009; Busi *et al.*, 2013). Essa definição é útil para orientação prática de aplicação, mas é insuficiente para interpretar a seleção evolutiva. A seleção natural opera, sobre o efeito biológico que a dose aplicada exerce sobre cada indivíduo (Renton *et al.*, 2011), e esse efeito varia conforme estágio fenológico, condições ambientais durante e após a aplicação, qualidade de cobertura foliar, e características fisiológicas e genéticas do próprio indivíduo.

Propõe-se, portanto, uma distinção operacional entre duas categorias de subdose. Subdose agrônômica é a dose nominalmente inferior à recomendação comercial; é a categoria utilizada na literatura clássica de Neve, Busi e Powles, e refere-se à dose aplicada por área. Subdose biológica, por sua vez, é definida pelo efeito real da dose no indivíduo selecionável: é qualquer dose efetiva que não impede sobrevivência, recuperação e possível reprodução de um indivíduo ou família

localizada na cauda de tolerância da população. Sob essa definição, uma dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ não é subdose em sentido agrônomo; overdose na realidade; mas pode atuar como dose biologicamente subletal para uma progênie capaz de manter biomassa funcional acima do limiar R^* sob essa pressão.

Operacionalmente, neste estudo, a subdose biológica foi mensurada via critério de subletalidade funcional: biomassa residual $\geq 30\%$ da testemunha. Essa métrica é um indicador biológico de sobrevivência e potencial reprodutivo, mas não substitui validação direta de produção de sementes viáveis. A operacionalização adotada transforma o conceito potencialmente circular ('subdose é a dose que selecionou') em uma propriedade empiricamente testável a priori, antes que a seleção em campo opere — característica essencial para que o conceito tenha valor diagnóstico e preditivo.

Essa distinção não contradiz a literatura clássica de subdoses; amplia sua interpretação. Os estudos de Neve, Powles e Busi descrevem o mecanismo evolutivo central: o enriquecimento poligênico ao longo de gerações depende de sobrevivência reprodutiva sob pressão seletiva. O elemento causal não é a dose nominal em si, mas a permanência de sobreviventes capazes de contribuir geneticamente. A reformulação proposta aqui apenas explicita que essa sobrevivência reprodutiva pode ocorrer também sob doses agronomicamente altas, quando indivíduos da cauda de tolerância da população mantêm desempenho funcional. O fenômeno evolutivo é o mesmo; a categoria descritiva é que precisa ser refinada.

4. 4. 3 Reinterpretando o conceito de subdose em populações de campo

A diferença entre os achados deste estudo e os obtidos pelos experimentos clássicos de seleção em subdoses reflete também, o estado inicial da população avaliada. Nos experimentos de Busi; Powles (2009), a população de partida foi o biótipo VLR1 de *L. rigidum*, mantido em ausência de seleção desde 1985 — uma população essencialmente virgem em termos de exposição ao glifosato. Sob essas condições, a aplicação de doses sub-letais ao longo de três a quatro gerações enriquece progressivamente alelos de pequeno efeito e leva à manifestação fenotípica da resistência. Já a população avaliada no presente estudo é oriunda de campo, com histórico provável de muitas gerações de exposição a glifosato em sistema de cana

de açúcar com rotação de soja. A variação acumulada e/ou remanescente; nessa população é, em parte, resultado dessa história prévia de seleção.

Essa diferença altera a pergunta biológica. Em populações inicialmente suscetíveis, a questão é como doses sub-letais recorrentes enriquecem alelos de pequeno efeito ao longo de gerações. Em populações de campo já moldadas pela seleção, a pergunta passa a ser onde a variação acumulada tem maior potencial/expressão genética. Nesse contexto, a dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ funcionou como condição discriminatória capaz de revelar uma cauda funcional rara que não seria detectada por médias populacionais.

O presente resultado também refina a associação clássica entre doses altas e seleção exclusiva de alelos de grande efeito. A dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ foi alta, mas a resposta observada não se comportou como uma triagem qualitativa simples, na qual poucas plantas sobreviveriam por efeito discreto e homogêneo. Ao contrário, o padrão foi quantitativo: múltiplas progênies apresentaram níveis intermediários de retenção de biomassa sob limiares menos estritos (cinco famílias acima de $\theta = 0,20$; três acima de $\theta = 0,25$), a Família 27 representou o extremo superior, e a exclusão dessa família reduziu, mas não eliminou, o sinal de evolvabilidade. Assim, sem excluir a possibilidade de alelos de maior efeito, pois não houve validação molecular, os dados não sustentam uma leitura exclusivamente monogênica ou qualitativa da resposta sob alta dose. O padrão observado é mais compatível característica quantitativa revelada por dose discriminatória intensa, possivelmente envolvendo combinações poligênicas e mecanismos não relacionados ao sítio de ação (NTSR), conforme demonstrado em outras espécies daninhas (Délye, 2013; Yu; Powles, 2014; Comont *et al.*, 2020, 2022; Cai *et al.*, 2023; Han *et al.*, 2021).

A frase mais precisa para descrever o achado do presente capítulo é, portanto, a seguinte: a condição crítica para a expressão de variância selecionável ocorre quando a dose aplicada permanece biologicamente subletal para indivíduos ou famílias localizados na distribuição superior de tolerância. Essa formulação preserva a contribuição original do trabalho sem entrar em oposição com a literatura clássica de seleção em subdoses, e oferece um arcabouço unificador que acomoda os dois fenômenos como manifestações do mesmo mecanismo evolutivo (sobrevivência reprodutiva sob pressão seletiva) em condições de populações distintas.

4. 4. 4 A Família 27 e a cauda selecionável

A Família 27 não deve ser tratada como ponto extremo estatístico isolado. Ela representa a unidade biológica que o delineamento por progênie foi desenhado para detectar. Em uma análise baseada em *bulk*, sua contribuição seria diluída na média populacional, como documentado no Capítulo 2. A análise de sensibilidade conduzida aqui (Tabela 3) demonstra que, mesmo após exclusão da F27, I_A em 2.160 g e.a. ha⁻¹ permanece elevado: 0,366 sob $m = 4$ (correspondente a aproximadamente 38 vezes a mediana de história de vida de Hansen *et al.* (2011) e 122 vezes a mediana global); 0,092 sob $m = 1$ (10 e 31 vezes, respectivamente). O sinal estatístico do efeito de progênie cai de significativo ($p = 0,033$) para marginal ($p = 0,098$), o que reflete o aumento de incerteza ao reduzir n para 18 progênie, mas a variação genética substancial entre famílias persiste. Adicionalmente, a análise de sensibilidade ao limiar θ (Tabela 4) revela que outras quatro famílias (7, 11, 34 e 38) carregam tolerância relevante, mesmo que não atinjam o limiar estrito de classificação R^* sob $\theta = 0,30$.

Esse padrão é evolutivamente esperado em populações de campo sob seleção prolongada. A seleção natural não exige que a resistência esteja amplamente distribuída em muitas famílias para começar a operar (Hansen; Houle, 2008; Walsh; Blows, 2009); basta que alguns indivíduos sobrevivam, recuperem crescimento e deixem descendentes. A concentração relativa do sinal genético na Família 27, com contribuição complementar das famílias 7, 11, 34 e 38, indica que o potencial selecionável está localizado em uma fração menor mas não única distribuída na população. Essa estrutura é coerente com as expectativas teóricas sobre evolução de resistência por combinação de alelos de pequeno efeito (Kreiner *et al.*, 2018), embora não permita descartar contribuição adicional de alelos de maior efeito sem caracterização molecular.

A interpretação correta do capítulo, dadas as três análises de sensibilidade, é a seguinte: o pico de I_A em 2.160 g e.a. ha⁻¹ deve ser descrito como variação selecionável detectável, concentrada (não exclusivamente localizada) em uma progênie materna (F27) com indivíduos capazes de manter biomassa funcional sob forte pressão de glifosato. Essa descrição é mais informativa, e mais honesta, do que afirmar variância uniformemente distribuída em toda a população. Reconhece o que o

dado mostra (presença de cauda funcional com pico em uma família e contribuição de outras quatro) sem inflacionar o que ele permite inferir (estrutura poligênica espalhada em toda a população).

4. 4. 5 Limite biológico em dose extrema

O contraste entre 2.160 e 4.320 g e.a. ha⁻¹ é um dos resultados mais informativos. Embora as médias de MSR sejam praticamente idênticas (0,088 e 0,084, respectivamente), a estrutura de variância muda drasticamente: σ_{ENTRE}^2 em 2.160 é estimada em 0,0011 (significativa), enquanto em 4.320 é truncada a zero pela convenção estatística adotada. Esse comportamento sugere que a dose extrema ultrapassou a faixa em que a variação funcional pode ser expressa. Em termos biológicos, 4.320 g e.a. ha⁻¹ não apenas suprime o crescimento médio, mas elimina a cauda selecionável detectada na dose anterior.

Existe, portanto, uma faixa intermediária no gradiente em que a seleção é suficientemente intensa para separar fenótipos sem ser tão extrema a ponto de eliminar toda a variação funcional. Essa observação é coerente com expectativas teóricas sobre o *trade-off* entre intensidade de seleção e tamanho efetivo da população sobrevivente (Hansen; Houle, 2008; Walsh; Blows, 2009): doses excessivamente altas elevam a intensidade de seleção, mas colapsam $N_{efetivo}$, reduzindo a possibilidade de detectar (e a possibilidade biológica de manifestar) variação aditiva acessível.

É importante enfatizar que essa interpretação não deve ser traduzida em recomendação prática de aumento de dose. O manejo da resistência não se resolve elevando doses indefinidamente, pelo contrário, a literatura clássica demonstra que diversificação de mecanismos de ação, rotação e manejo integrado de plantas daninhas são as estratégias eficazes (Powles; Yu, 2010; Norsworthy *et al.*, 2012; Beckie *et al.*, 2019). O resultado aqui indica apenas que doses discriminatórias intensas podem ser úteis em programas de monitoramento para revelar variação funcional rara, antes que essa variação se manifeste como falha de controle em campo.

4. 4. 6 Implicações para Monitoramento e Manejo

A principal implicação deste capítulo é metodológica. O monitoramento baseado apenas em *bulk* ou em médias populacionais pode não detectar a fração da população que mais importa no início do processo evolutivo (Capítulo 2). A individualização de progênies permite localizar famílias que mantêm desempenho funcional sob pressão seletiva e, portanto, melhora a sensibilidade do diagnóstico precoce. O conceito R^* (Capítulo 3) complementa essa abordagem ao transformar um gradiente quantitativo de biomassa em um estado operacional binário definido por um limiar funcional ancorado em propriedade empírica do dado (a divergência entre métodos no GR_{70}). A evolvabilidade I_A , por sua vez, fornece uma segunda camada de interpretação, indicando se a variação associada ao desempenho sob herbicida apresenta estrutura genética entre progênies.

Combinadas, essas três informações (progênies, R^* e I_A) permitem três níveis distintos de inferência. Primeiro, o método de amostragem por progênies permite detectar a presença de sobreviventes funcionais que o método tradicional perde. Segundo o critério R^* localiza esses sobreviventes em famílias específicas e quantifica sua frequência estimada na população. Terceiro, I_A indica se existe potencial evolutivo acessível associado a essa cauda funcional. Essa estratificação é mais informativa do que classificar simplesmente a população como resistente ou suscetível.

Do ponto de vista prático, o resultado reforça que o problema central do manejo não é apenas evitar doses abaixo da recomendação de bula. É necessário evitar qualquer situação em que a dose efetiva no indivíduo seja biologicamente subletal, o que inclui falhas de aplicação, uso em plantas fora do estágio ideal, baixa cobertura, condições ambientais desfavoráveis à ação do herbicida e dependência prolongada do mesmo mecanismo de ação. Em todos esses casos, a seleção pode atuar sobre indivíduos que mantêm biomassa funcional suficiente para recuperar crescimento e reproduzir.

4. 4. 7 Limitações e Perspectivas

A interpretação dos resultados deve considerar limitações que delimitam o alcance das inferências propostas.

Primeiro, o experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições controladas. A associação entre biomassa residual e sucesso reprodutivo em campo permanece, portanto, hipotética. A manutenção de biomassa funcional é um indicador biológico plausível de sobrevivência sob seleção, mas não substitui medições diretas de produção de sementes viáveis, competição interespecífica e persistência multigeracional em ambiente agrícola. Validar essa associação em campo é frente prioritária de pesquisa futura. Trabalhos como os de Vila-Aiub *et al.* (2009) sobre custos adaptativos de resistência, e os de Comont *et al.* (2020) sobre *trade-offs fitness-resistência*, fornecem o arcabouço metodológico para essa validação.

Segundo a ausência de validação molecular impede determinar o mecanismo causal da resposta diferencial observada na Família 27 e nas demais famílias da cauda funcional. O fenótipo R^* , conforme operacionalizado no Capítulo 3, é por construção agnóstico ao mecanismo, pois ele captura desempenho funcional integrado, qualquer que seja sua base bioquímica. Mas a caracterização molecular (mutação em EPSPS, amplificação gênica, mecanismos NTSR mediados por citocromos P450, glutathione-S-transferases ou transportadores ABC) é necessária para conectar o framework fenotípico a uma explicação causal (Yu; Powles, 2014; Sammons; Gaines, 2014; Han *et al.*, 2021; Cai *et al.*, 2023).

Terceiro, as estimativas de variância genética dependem do pressuposto adotado sobre estrutura de parentesco entre progênies. A análise de sensibilidade demonstrou que a resposta relativa das análises (pico em 2.160 g e.a. ha⁻¹) é preservada sob qualquer cenário realista de parentesco. Os valores absolutos de I_A , entretanto, devem ser apresentados com a faixa de incerteza correspondente (0,147 a 0,587) em qualquer comparação com outros estudos. Genotipagem molecular para estimar relações genéticas reais entre indivíduos da população, em estudos futuros, permitiria refinar substantivamente essas estimativas.

Quarto, valores nulos ou próximos a zero de σ_A^2 em determinadas doses devem ser interpretados como ausência de sinal detectável no desenho amostral adotado (19 progênies × 4 repetições), não como ausência absoluta de variação genética biológica. Hoffmann; Merilä (1999), em revisão clássica sobre herdabilidade sob estresse, discutem formalmente como o particionamento de variância é sensível ao tamanho amostral e à intensidade do estresse. Estudos futuros com maior número de progênies ($n \geq 30$) e maior número de repetições por combinação fortaleceriam

substantivamente o poder estatístico para detectar variância em todas as doses do gradiente.

Quinto, este estudo avalia uma única população de campo, o que não permite avaliar variação geográfica nem distinguir hipóteses sobre a origem da variação observada — se *in situ* (mutação local seguida de seleção) ou alóctone (introgressão de alelos resistentes por fluxo gênico). A extensão do framework para múltiplas populações é frente natural de pesquisa futura, e permitiria articulação direta com a literatura de genética de populações via estatísticas P_{ST} , Q_{ST} e F_{ST} (Whitlock, 2008; Meirmans; Hedrick, 2011; Jost *et al.*, 2018).

Apesar dessas limitações, os resultados sustentam a proposição central do capítulo: o potencial evolutivo acessível em populações de campo de *E. indica* é heterogeneamente distribuído ao longo do gradiente de seleção por glifosato, e essa heterogeneidade é detectável por métricas de genética quantitativa quando o desenho amostral preserva a identidade individual das progênes.

4. 5 CONCLUSÃO

Este capítulo demonstrou que o potencial evolutivo associado à retenção de biomassa sob glifosato não se distribui uniformemente ao longo do gradiente de doses em progênes maternas de *Eleusine indica*. A dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ concentrou a maior expressão de variação entre progênes, coincidindo com os maiores valores de herdabilidade, coeficiente de variação aditiva e evolvabilidade média-padronizada (I_A), enquanto a dose superior de 4.320 g e.a. ha⁻¹ promoveu o colapso da variância detectável.

Os resultados indicam que uma dose agronomicamente alta pode atuar como biologicamente subletal para a cauda selecionável da população, permitindo a manutenção de biomassa funcional em indivíduos ou famílias específicos. Assim, a resposta observada não se ajusta a uma triagem qualitativa simples associada exclusivamente a genes de grande efeito, mas revela variação quantitativa entre progênes, capturada pelo limiar R^* e pelo pico de I_A .

Propõe-se, portanto, uma releitura evolutiva do conceito de subdose: mais do que uma dose abaixo da recomendação agrônômica, subdose biológica é qualquer dose efetiva que permite sobrevivência funcional e potencial contribuição reprodutiva

de indivíduos selecionáveis. Essa interpretação amplia a literatura clássica de seleção em subdoses ao deslocar o foco da dose nominal para o efeito biológico no indivíduo.

Do ponto de vista aplicado, os resultados reforçam a importância do monitoramento em nível de indivíduos ou progênies, e não apenas por médias populacionais ou *bulk* de sementes. Também indicam que I_A pode ser uma métrica útil para detectar potencial evolutivo acessível antes que a resistência se manifeste como falha evidente de controle.

REFERENCIAS

ALBRECHT, A. J. P.; BIFFE, D. F.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; ALBRECHT, L. P.; OLIVEIRA JR., R. S. (ed.). Capim-pé-de-galinha: fundamentos e recomendações para manejo. Botucatu: **FEPAF**, 2025. 131 p. ISBN 978-65-89571-19-3. DOI: 10.54236/9786589571193.

BECKIE, H. J.; ASHWORTH, M. B.; FLOWER, K. C. Herbicide resistance gene flow in weeds: under-estimated and under-appreciated. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 283, p. 106566, 2019.

BONIN, A.; NICOLE, F.; POMPANON, F.; MIAUD, C.; TABERLET, P. Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 3, p. 697–708, 2006.

BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 2, p. 231–242, 2013. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2012.00282.x.

BUSI, R.; POWLES, S. B. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. **Heredity**, v. 103, n. 4, p. 318–325, 2009.

CAI, L.; COMONT, D.; MACGREGOR, D.; LOWE, C.; BEFFA, R.; SASKI, C.; NEVE, P. The blackgrass genome reveals patterns of non-parallel evolution of polygenic herbicide resistance. **New Phytologist**, v. 237, n. 5, p. 1891–1907, 2023. DOI: 10.1111/nph.18655.

COMONT, D.; LOWE, C.; HULL, R.; CROOK, L.; HICKS, H. L.; ONKOKESUNG, N.; BEFFA, R.; CHILDS, D. Z.; EDWARDS, R.; FRECKLETON, R. P.; NEVE, P. Evolution of generalist resistance to herbicide mixtures reveals a trade-off in resistance management. **Nature Communications**, v. 11, art. 3086, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-16896-0.

COMONT, D.; MACGREGOR, D. R.; CROOK, L.; HULL, R.; NGUYEN, L.; FRECKLETON, R. P.; CHILDS, D. Z.; NEVE, P. Dissecting weed adaptation: fitness and trait correlations in herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides*. **Pest Management Science**, v. 78, n. 8, p. 3039–3050, 2022. DOI: 10.1002/ps.6930.

DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 176–187, 2013. DOI: 10.1002/ps.3318.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 649–658, 2013. DOI: 10.1016/j.tig.2013.06.001.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. J. **An introduction to the bootstrap**. New York: **Chapman and Hall**, 1993. 436 p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Harlow: **Longman**, 1996. 464 p.

HAN, H.; YU, Q.; BEFFA, R.; GONZÁLEZ, S.; MAIWALD, F.; WANG, J.; POWLES, S. B. Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. **The Plant Journal**, v. 105, n. 1, p. 79–92, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15040.

HANSEN, T. F.; HOULE, D. Measuring and comparing evolvability and constraint in multivariate characters. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, n. 5, p. 1201–1219, 2008. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2008.01573.x.

HANSEN, T. F.; PÉLABON, C.; HOULE, D. Heritability is not evolvability. **Evolutionary Biology**, v. 38, n. 3, p. 258–277, 2011. DOI: 10.1007/s11692-011-9127-6.

HOFFMANN, A. A.; MERILÄ, J. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 3, p. 96–101, 1999. DOI: 10.1016/S0169-5347(99)01595-5.

HOULE, D. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. **Genetics**, v. 130, n. 1, p. 195–204, 1992.

HOULE, D.; BOLSTAD, G. H.; VAN DER LINDE, K.; HANSEN, T. F. Mutation predicts 40 million years of fly wing evolution. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 447–450, 2017. DOI: 10.1038/nature23473.

HURLBERT, S. H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological Monographs**, v. 54, n. 2, p. 187–211, 1984. DOI: 10.2307/1942661.

JOST, L.; ARCHER, F.; FLANAGAN, S.; GAGGIOTTI, O.; HOBAN, S.; LATCH, E. Differentiation measures for conservation genetics. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 7, p. 1139–1148, 2018. DOI: 10.1111/eva.12590.

KREINER, J. M.; STINCHCOMBE, J. R.; WRIGHT, S. I. Population genomics of herbicide resistance: adaptation via evolutionary rescue. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, p. 611–635, 2018. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042817-040038.

MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 1, p. 5–18, 2011. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x.

MURPHY, B. P.; TRANEL, P. J. Target-site mutations conferring herbicide resistance. **Plants**, v. 8, n. 10, art. 382, 2019. DOI: 10.3390/plants8100382.

NEVE, P.; POWLES, S. B. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. **Heredity**, v. 95, n. 6, p. 485–492, 2005a. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800751.

NEVE, P.; POWLES, S. B. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1154–1166, 2005b. DOI: 10.1007/s00122-005-1947-2.

NEVE, P.; VILA-AIUB, M.; ROUX, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 783–793, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03034.x.

NORSWORTHY, J. K.; WARD, S. M.; SHAW, D. R.; LLEWELLYN, R. S.; NICHOLS, R. L.; WEBSTER, T. M.; BRADLEY, K. W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S. B.; BURGOS, N. R.; WITT, W. W.; BARRETT, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, v. 60, n. sp. 1, p. 31–62, 2012. DOI: 10.1614/WS-D-11-00155.1.

OLIVEIRA JR., R. S.; WITTER, A. P. W.; FERREIRA, L. A. I.; GRANZIOLI, L.; BARION, J. H.; PASQUALOTO, S. P.; BIFFE, D. F.; CONSTANTIN, J. Monitoramento de resistência em biótipos de *Digitaria insularis* e *Eleusine indica* no Brasil. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 6, n. 1, 31 out. 2025. ISSN 2675-4150. Disponível em: www.hrac-br.org.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 317–347, 2010. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119.

RENTON, M.; DIGGLE, A.; MANALIL, S.; POWLES, S. B. Does cutting herbicide rates threaten the sustainability of weed management in cropping systems? **Journal of Theoretical Biology**, v. 283, n. 1, p. 14–27, 2011. DOI: 10.1016/j.jtbi.2011.05.010.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1367–1377, 2014. DOI: 10.1002/ps.3743.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 751–767, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03055.x.

WALSH, B.; BLOWS, M. W. Abundant genetic variation + strong selection = multivariate genetic constraints: a geometric view of adaptation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 41–59, 2009. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120232.

WHITLOCK, M. C. Evolutionary inference from QST. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 8, p. 1885–1896, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03712.x.

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, v. 166, n. 3, p. 1106–1118, 2014. DOI: 10.1104/pp.114.242750.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando este trabalho começou, a pergunta era simples: a população de *Eleusine indica* coletada em Lençóis Paulista é resistente ao glifosato? O que os dados mostraram, ao longo dos três capítulos experimentais, foi que essa pergunta estava mal formulada. Resistência não é um estado fixo que uma população tem ou não tem; é um processo em andamento, com estágios, com gradientes, com genótipos que já cruzaram um limiar enquanto a maioria ainda não o fez. Identificar onde uma população está nesse processo exige métodos capazes de enxergar sua estrutura genética, e não apenas seu comportamento médio. Foi essa constatação que organizou os quatro capítulos desta dissertação.

O Capítulo 2 deixou isso claro de forma concreta. A mistura de sementes (*bulk*) produziu uma curva dose–resposta que não é incorreta em sentido técnico, mas é insuficiente em sentido biológico. O GR_{50} entre os dois métodos foi praticamente idêntico (117,00 versus 120,66 g e.a. ha⁻¹), e alguém que olhasse apenas para esse parâmetro concluiria que *bulk* e progênies são equivalentes. Mas o GR_{70} já divergiu (534,51 g e.a. ha⁻¹ no *bulk* contra 365,58 g e.a. ha⁻¹ nas progênies), e o GR_{80} não pôde ser estimado pelo *bulk*, enquanto as progênies foi estimado em 715,54 g e.a. ha⁻¹. A família mais tolerante precisou de 2.211,39 g e.a. ha⁻¹ para atingir esse nível de supressão; quase seis vezes mais do que a família mais sensível. Toda essa variação estava presente na população, e o método de amostragem por *bulk* não enxergava nada dela.

O Capítulo 3 aplicou o conceito de Estado Operacional de Resistência (R*) sobre o mesmo material e identificou a Família 27 como unidade funcionalmente resistente: dois dos quatro indivíduos avaliados retiveram, respectivamente, 32,5% e 32,3% de biomassa relativa sob a dose discriminatória de 2.160 g e.a. ha⁻¹, ambos acima do limiar funcional de 30%. A frequência estimada de progênies R* foi de 5,26%, com limite superior do intervalo de confiança 99% em 33,11%, indicando que a resistência já está estabelecida na população.

O gradiente contínuo de resposta entre as 19 famílias, sem separação nítida entre grupos sensíveis e resistentes, sugere que o mecanismo subjacente é poligênico, muito provavelmente envolvendo elementos de resistência não

relacionada ao sítio de ação (NTSR). Essa inferência tem implicação direta para o manejo: populações com arquitetura poligênica respondem mais lentamente à seleção do que aquelas com mutação única no sítio-alvo, mas são também mais difíceis de detectar nos estágios iniciais e mais difíceis de reverter quando a resistência já está consolidada. Esse é exatamente o tipo de situação em que o diagnóstico precoce importa, e em que diagnosticar pela média populacional é uma estratégia sistematicamente insuficiente.

O Capítulo 4 trouxe o resultado talvez mais importante, e também o mais contraintuitivo. Ao longo das sete doses avaliadas, a ANOVA particionada por progênes detectou efeito significativo de família apenas em uma delas: 2.160 g e.a. ha⁻¹ ($F = 1,92$; $p = 0,033$), embora um sinal marginalmente detectável tenha sido observado a 270 g e.a. ha⁻¹ ($F = 1,77$; $p = 0,053$). Foi nessa dose discriminatória de 2.160 g e.a. ha⁻¹ que a herdabilidade no sentido restrito atingiu seu máximo ($h^2 = 0,478$ sob o pressuposto de meios-irmãos), assim como a evolvabilidade média-padronizada ($I_A = 0,587$; IC 95% por bootstrap = 0,109–1,410). Mesmo sob o cenário mais conservador, compatível com a biologia autógama da espécie ($m = 1$), I_A permaneceu em 0,147; aproximadamente quinze vezes a mediana de evolvabilidade reportada por Hansen *et al.* (2011) para traços de história de vida.

Na dose imediatamente superior, 4.320 g e.a. ha⁻¹, a biomassa média caiu menos de 5% em relação a 2.160 (de 0,088 para 0,084 em MSR), mas a variância entre progênes colapsou e a evolvabilidade despencou a zero. Quando a média permanece praticamente idêntica e a variância desaparece, o que mudou foi a biologia, e não a matemática: a dose mais alta eliminou os poucos sobreviventes que ainda existiam na dose anterior, apagando a variabilidade que sustentaria qualquer resposta evolutiva adicional.

Mais dose, portanto, não gerou mais controle evolutivo; gerou colapso da variação selecionável. Isso significa que a dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ que é equivalente à maior dose de bula regularmente recomendada, é simultaneamente a que melhor controla a infestação em campo e a que oferece as condições mais favoráveis para que os poucos sobreviventes contribuam reprodutivamente para a geração seguinte, deslocando progressivamente a população em direção a um estado de resistência consolidada. O resultado constitui, uma crítica empírica e quantitativa à estratégia isolada de aumentar a dose recomendada como resposta à resistência: ela tende a

deslocar o problema, não a resolvê-lo, sobretudo em populações com históricos de utilização do mesmo mecanismo de ação.

Olhando o conjunto, o que fica é a confirmação de que as três hipóteses orientadoras desta dissertação se sustentam, e se sustentam de forma articulada entre si. O método de amostragem afeta o que se enxerga da resistência (Cap. 2); a população já abriga genótipos R^* em frequência detectável (Cap. 3); e o pico de potencial evolutivo ocorre na dose discriminatória que usamos para classificar esses genótipos (Cap. 4). Essa convergência é o que reforça a consistência interna como evidência biológica e não como artefato metodológico.

O estudo tem limitações conhecidas e explicitadas ao longo dos capítulos: uma única população de campo, $n = 19$ progênies maternas, ausência de confirmação molecular do mecanismo causal e ausência de validação direta de sucesso reprodutivo dos genótipos R^* em condições de campo. Cada uma dessas limitações define uma frente prioritária de pesquisa futura — extensão a múltiplas populações georreferenciadas para articulação com estatísticas P_{ST} , Q_{ST} e F_{ST} ; caracterização molecular dos mecanismos NTSR candidatos (citocromos P450, glutathione-S-transferases, transportadores ABC e variação em EPSPS); e ensaios de fitness multigeracional em campo para verificar a tradução da retenção funcional de biomassa em contribuição reprodutiva efetiva.

Apesar dessas limitações, o estudo cumpre o que se propôs: demonstrar que é possível descrever a estrutura evolutiva de uma população resistente a partir de fenótipos simples; sem genômica, sem equipamentos sofisticados; apenas com progênies conduzidas em casa de vegetação, análise de variância adequadamente particionada e a escolha correta de como formular a pergunta. Resistência a herbicidas, no fim, não é apenas um problema agrônomo a ser combatido; é também um fenômeno evolutivo a ser compreendido, e essa compreensão começa quando se substitui a pergunta "a população é resistente?" por "onde, em que frequência e sob qual pressão seletiva a variação selecionável se expressa nessa população?". É esta segunda pergunta que esta dissertação procurou responder, e cuja extensão a outras espécies, outros agentes seletivos e outros sistemas de manejo constitui sua principal contribuição para uma vigilância evolutivamente informada da resistência.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, A. J. P. *et al.* (ed.). Capim-pé-de-galinha: fundamentos e recomendações para manejo. Botucatu: **FEPAF**, 2025. 131 p. ISBN 978-65-89571-19-3. DOI: 10.54236/9786589571193.
- BECKIE, H. J.; ASHWORTH, M. B.; FLOWER, K. C. Herbicide resistance gene flow in weeds: under-estimated and under-appreciated. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 283, p. 106566, 2019.
- BECKIE, H. J.; HARKER, K. N. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. *Pest Management Science*, v. 73, n. 6, p. 1045–1052, 2017.
- BECKIE, H. J. *et al.* Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, v. 14, n. 2, p. 428–445, 2000.
- BLANCO-MORENO, J. M. *et al.* Spatial distribution of *Lolium rigidum* seedlings following seed dispersal by combine harvesters. **Weed Research**, v. 44, n. 5, p. 375–387, 2004.
- BONIN, A.; NICOLE, F.; POMPANON, F.; MIAUD, C.; TABERLET, P. Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 3, p. 697–708, 2006.
- BROMMER, J. E. Whither PST? The approximation of QST by PST in evolutionary and conservation biology. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 6, p. 1160–1168, 2011.
- BURGOS, N. R. *et al.* Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 4–20, 2013.
- BURNET, M. W. M. *et al.* Increased detoxification is a mechanism of simazine resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 207–218, 1993.
- BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 2, p. 231–242, 2013.
- BUSI, R.; POWLES, S. B. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. **Heredity**, v. 103, n. 4, p. 318–325, 2009.
- BUSI, R.; VILA-AIUB, M. M.; POWLES, S. B. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 106, n. 5, p. 817–824, 2011. DOI: 10.1038/hdy.2010.124.

BUSI, R. *et al.* Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 1281-1290, 2008.

CAI, L. *et al.* The blackgrass genome reveals patterns of non-parallel evolution of polygenic herbicide resistance. **New Phytologist**, v. 237, n. 5, p. 1891–1907, 2023. DOI: 10.1111/nph.18655.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (ed.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2. ed. Campinas: HRAC-BR, 2004. p. 3–22.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (ed.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2009. p. 35–55.

CLOPPER, C. J.; PEARSON, E. S. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. **Biometrika**, v. 26, n. 4, p. 404–413, 1934. DOI: 10.1093/biomet/26.4.404.

COMONT, D. *et al.* Dissecting weed adaptation: fitness and trait correlations in herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides*. **Pest Management Science**, v. 78, n. 8, p. 3039-3050, 2022. DOI: 10.1002/ps.6930.

COMONT, D. *et al.* Evolution of generalist resistance to herbicide mixtures reveals a trade-off in resistance management. **Nature Communications**, v. 11, art. 3086, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-16896-0.

CROSSA, J.; VENCOSKY, R. Basic sampling strategies: theory and practice. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; GOLDBERG, E. (ed.). *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. Rome: **Bioversity International**, 2011. p. 1-28.

CROSSA, J.; VENCOSKY, R. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 936-942, 1994.

CUMMINS, I. *et al.* Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 15, p. 5812–5817, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1221179110.

CUMMINS, I. *et al.* Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p. 266-280, 2011.

DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 176–187, 2013. DOI: 10.1002/ps.3318.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 649–658, 2013. DOI: 10.1016/j.tig.2013.06.001.

DOBSON, A. J.; BARNETT, A. G. An introduction to generalized linear models. 3. ed. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC, 2008. 307 p.
EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. J. An introduction to the bootstrap. New York: **Chapman and Hall**, 1993. 436 p.

EUROPEAN HERBICIDE RESISTANCE COMMITTEE. **European guidelines to conduct herbicide resistance tests**. [S.l.]: EHRC, 2017.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Harlow: **Longman**, 1996. 464 p.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1971. 333 p.

FISHER, R. A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v. 52, p. 399-433, 1918.

GAINES, T. A. *et al.* Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GRESSEL, J. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, v. 65, n. 11, p. 1164–1173, 2009. DOI: 10.1002/ps.1842.

GRESSEL, J. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. **Pest Management Science**, v. 67, p. 253-257, 2011.

GUPTA, S. *et al.* Interchromosomal linkage disequilibrium and linked fitness cost loci associated with selection for herbicide resistance. **New Phytologist**, v. 238, p. 1263-1277, 2023.

HAN, H.; YU, Q.; BEFFA, R.; GONZÁLEZ, S.; MAIWALD, F.; WANG, J.; POWLES, S. B. Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. **The Plant Journal**, v. 105, n. 1, p. 79–92, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15040.

HANSEN, T. F.; HOULE, D. Measuring and comparing evolvability and constraint in multivariate characters. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, n. 5, p. 1201–1219, 2008. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2008.01573.x.

- HANSEN, T. F.; PÉLABON, C.; HOULE, D. Heritability is not evolvability. **Evolutionary Biology**, v. 38, n. 3, p. 258–277, 2011. DOI: 10.1007/s11692-011-9127-6.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. Tradução de Laura Roberta Pinto Utz *et al.* 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 4. ed. Sunderland: **Sinauer Associates**, 2007.
- HARTWAY, C. R.; OTT, J. P.; GRULKE, N. E. Plant life span and persistence of soil seedbanks predict the emergence of herbicide resistance in noxious weeds. **Weed Science**, v. 70, p. 448–454, 2022.
- HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. [S. l.], 2026. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 05 maio 2026.
- HEAP, I.; DUKE, S. O. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1040–1049, 2018. DOI: 10.1002/ps.4760.
- HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 2. ed. Sudbury: **Jones and Bartlett Publishers**, 2000.
- HESS, M. *et al.* Use of the extended BBCH scale — general for the description of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, v. 37, n. 6, p. 433–441, 1997.
- HOFFMANN, A. A.; MERILÄ, J. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 3, p. 96–101, 1999. DOI: 10.1016/S0169-5347(99)01595-5.
- HOULE, D. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. **Genetics**, v. 130, n. 1, p. 195–204, 1992.
- HOULE, D.; BOLSTAD, G. H.; VAN DER LINDE, K.; HANSEN, T. F. Mutation predicts 40 million years of fly wing evolution. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 447–450, 2017. DOI: 10.1038/nature23473.
- HURLBERT, S. H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological Monographs**, v. 54, n. 2, p. 187–211, 1984.
- IWAKAMI, S. *et al.* CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. **New Phytologist**, v. 221, p. 2112–2122, 2019.
- JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, n. 2, p. 176–193, 1996.
- JOST, L. *et al.* Differentiation measures for conservation genetics. **Evolutionary Applications**, v. 11, p. 1139–1148, 2018.

KALSING, A. *et al.* The population genomics of *Conyza* spp. in soybean macroregions suggest the spread of herbicide resistance through intraspecific and interspecific gene flow. **Scientific Reports**, v. 14, art. 19536, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-70153-8.

KREINER, J. M. *et al.* Multiple modes of convergent adaptation in the spread of glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 42, p. 21076-21084, 2019.
KREINER, J. M.; STINCHCOMBE, J. R.; WRIGHT, S. I. Population genomics of herbicide resistance: adaptation via evolutionary rescue. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, p. 611–635, 2018.

KRUUK, L. E. B. Estimating genetic parameters in natural populations using the 'animal model'. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 359, p. 873-890, 2004.

LEWONTIN, R. C. The units of selection. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 1, p. 1-8, 1970.

LOUREIRO, I.; ESCORIAL, M. C.; CHUECA, M. C. Pollen-mediated movement of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. **PLoS One**, v. 11, n. 6, e0157892, 2016.

MARKUS, C. *et al.* Avaliação da ocorrência e distribuição de populações de capim-arroz escapes aos herbicidas no estado do Rio Grande do Sul. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 5, n. 3, 2024. ISSN 2675-4150.

MARTINS, H. L. *et al.* Mapeamento da resistência de capim-amargoso a herbicidas no estado da Bahia. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 5, n. 2, 2024. ISSN 2675-4150.
MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 5-18, 2011.

MURPHY, B. P.; TRANEL, P. J. Target-site mutations conferring herbicide resistance. **Plants**, v. 8, n. 10, art. 382, 2019. DOI: 10.3390/plants8100382.

NARUM, S. R.; HESS, J. E. Comparison of FST outlier tests for SNP loci under selection. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, Supl. 1, p. 184-194, 2011.

NEVE, P. *et al.* Modelling evolution and management of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Weed Research**, v. 51, n. 2, p. 99–112, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-3180.2010.00838.x.

NEVE, P.; POWLES, S. B. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. **Heredity**, v. 95, n. 6, p. 485–492, 2005a. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800751.

NEVE, P.; POWLES, S. B. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1154–1166, 2005b. DOI: 10.1007/s00122-005-1947-2.

NEVE, P.; VILA-AIUB, M.; ROUX, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 783–793, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03034.x.

NORSWORTHY, J. K.; WARD, S. M.; SHAW, D. R.; LLEWELLYN, R. S.; NICHOLS, R. L.; WEBSTER, T. M.; BRADLEY, K. W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S. B.; BURGOS, N. R.; WITT, W. W.; BARRETT, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, v. 60, n. sp. 1, p. 31–62, 2012. DOI: 10.1614/WS-D-11-00155.1.

OLIVEIRA JR., R. S. *et al.* Monitoramento de resistência em biótipos de *Digitaria insularis* e *Eleusine indica* no Brasil. **Informe Técnico HRAC-BR**, v. 6, n. 1, 2025. ISSN 2675-4150.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 317–347, 2010. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119.

PRESTON, C.; POWLES, S. B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 88, n. 1, p. 8–13, 2002. DOI: 10.1038/sj/hdy/6800004.

PRESTON, C. *et al.* Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 54, n. 2, p. 123-134, 1996.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: **R Foundation for Statistical Computing**, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RENTON, M. *et al.* Does cutting herbicide rates threaten the sustainability of weed management in cropping systems? **Journal of Theoretical Biology**, v. 283, p. 14–27, 2011.

RENTON, M. *et al.* Herbicide resistance modelling: past, present and future. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1394–1404, 2014.

RITZ, C. *et al.* Dose-response analysis using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, e0146021, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0146021.

ROSS, S. M. **A first course in probability**. 8. ed. Upper Saddle River: **Pearson Prentice Hall**, 2010.

ROSS, S. M. **Introduction to probability models**. 10. ed. Burlington: **Academic Press**, 2010. 784 p.

SAETHER, S. A. *et al.* Inferring local adaptation from QST–FST comparisons: neutral genetic and quantitative trait variation in European populations of great snipe. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, n. 4, p. 1563-1576, 2007.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1367–1377, 2014. DOI: 10.1002/ps.3743.

SEEFELDT, S. S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v. 9, n. 2, p. 218–227, 1995. DOI: 10.1017/S0890037X00023253.

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

STREIBIG, J. C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v. 28, n. 6, p. 479–484, 1988.
TRANIEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p. 700-712, 2002.

VENCILL, W. K. *et al.* Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 60, n. esp. 1, p. 2–30, 2012. DOI: 10.1614/WS-D-11-00206.1.

VENCOVSKY, R. *et al.* Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: Recursos genéticos vegetais. Brasília: **EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, p. 751-767, 2009.

WALSH, B.; BLOWS, M. W. Abundant genetic variation + strong selection = multivariate genetic constraints: a geometric view of adaptation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 41–59, 2009. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120232.

WAPLES, R. S. Temporal variation in allele frequencies: testing the right hypothesis. **Evolution**, v. 43, n. 6, p. 1236-1251, 1989.

WHITLOCK, M. C. Evolutionary inference from QST. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1885-1896, 2008.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.

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

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART JR., C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 6–13, 2007. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.11.001.