Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate

Marcel Sereguin Cabral de Melo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2015

Marcel Sereguin Cabral de Melo
Engenheiro Agrônomo

Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Melo, Marcel Sereguin Cabral de
Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate / Marcel Sereguin Cabral de Melo. - - Piracicaba, 2015.
108 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Resistência 2. Mapeamento 3. Herdabilidade 4. Controle químico I. Título

CDD 632.58
M528L

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

- À Deus por manter-me sempre no caminho correto;

- À toda a minha família pela amizade, compreensão e carinho, especialmente à minha mãe Roseli Maria Sereguin, meu padrasto José Roberto Rizzotti, meu pai Djailson Cabbral de Melo, minha madrasta Simone Ribeiro de Melo, meu irmão Eduardo Aparecido Sereguin Cabral de Melo, meus primos Luís Fernando Sereguin Erbetta e Patrícia Stephanie Pasti, minha avó Maria Favorato Sereguin, meu tio Alexandre D. Erbetta e minhas tias Aurea Sereguin Erbetta e Rosane Sereguin;

- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pelos conhecimentos ensinados desde a graduação e pela oportunidade de realização deste trabalho;

- Ao Professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela orientação, amizade e oportunidades fornecidas ao longo de minha carreira como Cientista das Plantas Daninhas;

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida, em nível de Doutorado;

- À minha esposa Ticyana Carone Banzato, pela compreensão, carinho, companherismo e cuidados nos momentos de alegria e dificuldade;

- Ao amigo Engenheiro Agrônomo Dr. Marcelo Nicolai, pelos ensinamentos, amizade, companherismo, viagens, sugestões e paciência nas diferentes situações enfrentadas;

- Ao amigo Engenheiro Agrônomo Prof. Dr. Saul Jorge Pinto de Carvalho pelos conselhos, sugestões e amizade;

- A equipe de agrônomos da Monsanto Ltda. em especial ao Dr. Ramiro Fernando López-Ovejero pela colaboração com este trabalho;

- Ao amigo Engenheiro Agrônomo Msc. Murilo Sala Moreira pela amizade e iniciação de minha carreira na área da Ciência das Plantas Daninhas como tutor;

- Aos amigos da Gloriosa República Gato Preto pelos momentos de amizade e descontração;

- Aos amigos Alex Passos Laranjeiro, Eduardo Montanari, Renato Kato, Rodrigo José Cury de Toledo Piza, Válter Quintino Júnior e Heryaldo Tarozzo Filho (in memoriam), pelos momentos de treino, descontração e amizade.

- Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, em especial à Luciane Aparecida Lopes Toledo, Éder Cintra, Aparecido Donizete Serrano, Paulo Jaoude e Osmair Roberto Neves.

- Ao Grupo de Plantas Daninhas: Flávio Eduardo Botelhos Obara, Ana Beatriz Campos Almeida Prado, Lucas Elache Rosa, Marcelo Rodrigues Alves de Figueiredo, Caio Augusto de Castro Grossi Brunharo, Danilo Carvalho Pereira da Silva.

Muito Obrigado!

“I am driven by two main philosophies, know more today about the world than you knew yesterday and lessen the suffering of others, you’d be surprised how far that gets you.”

Neil Degrasse Tyson

SUMÁRIO

RESUMO.....9
ABSTRACT.....11
1 INTRODUÇÃO 13
Referências.....17
2 DISTRIBUIÇÃO E FREQUÊNCIA DAS POPULAÇÕES RESISTENTES DE CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) AO GLYPHOSATE EM REGIÕES AGRÍCOLAS DO BRASIL.....21
Resumo.....21
Abstract.....22
2.1 Introdução.....23
2.2 Material e Métodos.....25
2.3 Resultados e Discussão.....33
2.4 Conclusões.....45
Referências.....46
3 ALTERNATIVAS DE CONTROLE QUÍMICO DO CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) RESISTENTE AO GLYPHOSATE, COM HERBICIDAS REGISTRADOS PARA AS CULTURAS DE MILHO E ALGODÃO.....49
Resumo.....49
Abstract.....49
3.1 Introdução.....50
3.2 Material e Métodos.....53
3.3 Resultados e Discussão.....56
3.4 Conclusões.....62
Referências.....63
4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA PLANTA DANINHA *Digitaria insularis* AO HERBICIDA GLYPHOSATE.....69
Resumo.....69
Abstract.....69
4.1 Introdução.....70
4.2 Material e Métodos.....73
4.2.1 Absorção e translocação do herbicida glyphosate nos biótipos resistentes e suscetível de *Digitaria insularis*.....73

4.2.2 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Digitaria insularis*.....75
4.3 Resultados e Discussão.....78
4.3.1 Absorção e translocação do herbicida glyphosate nos biótipos resistentes e suscetível de *Digitaria insularis*.....78
4.3.2 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Digitaria insularis*.....87
4.4 Conclusões.....89
Referências.....89
5 HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DA PLANTA DANINHA *Digitaria insularis* AO GLYPHOSATE.....95
Resumo.....95
Abstract.....95
5.1 Introdução.....96
5.2 Material e Métodos.....98
5.3 Resultados e Discussão.....100
5.4 Conclusões.....105
Referências.....105

RESUMO

Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate

O glyphosate é o principal herbicida utilizado no manejo de plantas daninhas na agricultura, aplicado em alguns sistemas de forma repetitiva ao longo de cada ano. Esta prática selecionou biótipos resistentes de espécies de plantas daninhas, sendo o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) selecionado no Brasil. Portanto, se tornam necessários estudos para entender, manejar e reduzir a infestação do capim-amargoso resistente ao glyphosate. Dessa forma, esta pesquisa foi desenvolvida com os objetivos de: (i) mapear áreas do Brasil com possíveis infestações de capim-amargoso resistente ao glyphosate; (ii) avaliar alternativas químicas de seu manejo; (iii) elucidar os mecanismos de resistência ao glyphosate e; (iv) avaliar a herança genética dos genes que conferem resistência ao glyphosate. Para o desenvolvimento dos experimentos foram coletadas sementes de biótipos potencialmente resistentes de diversas regiões do Brasil onde ocorreram falhas de controle de *D. insularis* após a aplicação de glyphosate. Na primeira etapa da pesquisa foram realizados experimentos para determinação de uma dose discriminatória de triagementre as populações resistentes e suscetíveis ao glyphosate, através de curvas de dose-resposta, para identificar a resistência ao Glyphosate, sendo que estes dados foram utilizados para mapear a ocorrência de biótipos resistentes em algumas regiões do país. Na segunda etapa foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação visando encontrar herbicidas alternativos ao Glyphosate para controle do capim-amargoso, utilizando herbicidas recomendados para as culturas do milho e algodão, tanto em condições de aplicação de pré como em pós-emergência da planta daninha. Na terceira etapa foram realizados ensaios para determinar a existência de absorção e translocação diferencial do glyphosate em biótipos suscetíveis e resistentes, juntamente com a análise molecular para comparar a região 106 do gene que codifica a EPSPs nestes biótipos. Por fim um estudo de polinização cruzada foi conduzido para avaliar se genes de resistência ao glyphosate são transferidos para a geração seguinte após inflorescências de biótipos suscetíveis serem acondicionadas com as de biótipos resistentes, submetendo a geração seguinte a experimentos de curva de dose-resposta com o glyphosate. Através do modelo de curva dose-resposta do programa estatístico R, determinou-se a dose de 960 g e.a ha^{-1}, como a dose utilizada para triagem dos biótipos oriundos de diferentes regiões do Brasil. Com isto foram gerados mapas indicando a presença ou ausência de resistência ao herbicida, sendo que as região oeste do Paraná e sul do Mato Grosso do Sul apresentam maior número de localidades com a presença de biótipos resistentes. As alternativas de controle viáveis como pós-emergentes no estádio de um a dois perfilhos, foram os herbicidas Nicosulfuron, Imazapic + Imazapyr, Atrazine, Haloxifop-methyl e Tepraloxydim. Na pré-emergência do capim-amargoso os herbicidas Atrazine, Isoxaflutole, S-metolachlor, Clomazone, Diuron e Flumioxazin se apresentaram como eficazes para o controle desta espécie. Os resultados do experimento de absorção, translocação e comparação da região 106 não mostraram diferenças entre os biótipos resistente e suscetível. O experimento sobre cruzamento entre biótipos resistente e suscetível determinou a espécie *D.*

insularis como autógama e sem transferência de genes que causam a resistência ao glyphosate.

Palavras-chave: Resistência; Mapeamento; Herdabilidade; Controle químico

ABSTRACT

Survey, alternative management, resistance mechanisms and genetic inheritance of glyphosate resistant sourgrass (*Digitaria insularis*).

Glyphosate was the main herbicide used in agriculture for weed management, applied repetitively in some cropping systems throughout the year. This practice selected resistant weed biotypes to this herbicide. In Brazil, the glyphosate resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) has gained prominence in recent years due to its high capacity to spread across the country agriculture regions. Therefore, a study to understand, manage and reduce the glyphosate resistant sourgrass infestation becomes necessary. Thus, this research was developed with the objectives of: (i) mapping areas of Brazil with putative glyphosate resistant sourgrass infestations; (ii) evaluate alternative herbicides to manage resistant biotypes; (iii) elucidate the resistance mechanisms; (iv) Assess the genetic inheritance of the genes which confers resistance to glyphosate. For the development of the experiments putative resistant biotypes seeds were collected from different regions of Brazil where *D. insularis* survived after glyphosate application. In the first stage of this research, experiments were conducted to determine a screening dose to be used to identify glyphosate resistance in samples from the survey, through dose-response curves methodology. In the second stage an experiment was conducted in greenhouse conditions in order to test for alternative herbicides which control glyphosate resistant sourgrass, using recommended herbicides for the corn and cotton crops, both pre and post-emergents. In the third step, an experiment was conducted to assess the uptake and translocation of glyphosate in susceptible and resistant biotypes, with post molecular analysis to compare the region 106 of the EPSPS gene from both biotypes. Finally a cross-pollination study was conducted to assess whether glyphosate resistance genes are transferred to the next generation after inflorescences susceptible biotypes were packed with resistant biotypes, subjecting the next generation to dose-response curve experiments. Using the statistical software R for the dose-response analysis, the screening dose was determined as 960 g.a.e.ha^{-1}. Using this dose in the survey experiment, maps were generated indicating the presence or absence of glyphosate resistance, in which shows the western regions of Paraná and south part of Mato Grosso do Sul states, having more locations with the presence of resistant biotypes. The viable alternatives post-emergent herbicides to control *D. insularis* at 1 to 2 tillers stage were nicosulfuron, imazapic + imazapyr, atrazine, haloxyfop-methyl and tepraloxydim. In pre-emergence condition the herbicides atrazine, isoxaflutole, S-metolachlor, clomazone, diuron and flumioxazin showed effective control of this species. The results of the uptake, translocation and proline 106 mutation experiments showed no difference between the resistant and susceptible biotypes. The experiment on cross-polination between resistant and susceptible biotypes, determined *D. insularis* as a self-polinated species and no glyphosate resistance genes were transferred.

Keywords: Resistance; Mapping; Inheritance; Chemical control

1 INTRODUÇÃO

A terminologia planta daninha é de caráter antropomórfico a fim de caracterizar espécies de plantas indesejadas pelos seres humanos em uma determinada área. Quando presentes em meio a culturas estas geram competição por água, luz, nutrientes e espaço, em maior ou menor grau dependendo de fatores como espécie presente, densidade de ocorrência, grau de agressividade, distribuição espacial e período de convivência das mesmas durante o ciclo da cultura. Estes fatores são modificados pelo tipo de solo e condições climáticas. Dentre todos os fatores que influenciam o nível de competição, o mais importante é o período em que a comunidade infestante e as plantas cultivadas estão disputando os recursos do meio, sendo denominado como período crítico de prevenção da interferência (PCPI) (SILVA et al., 2007; PITELLI, 1985).

Existem cerca de 300 espécies pertencentes ao gênero *Digitaria* sp. distribuídas no mundo, tanto em clima tropical quanto subtropical (CANTO-DOROW, 2001). O Brasil é o país que apresenta maior diversidade de espécies do gênero *Digitaria* sp., possuindo 26 espécies nativas e 12 exóticas em seu território. Entre estas espécies, o capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde) é nativo de regiões tropicais e subtropicais da América, onde pode ser encontrado em pastagens, cafezais, pomares e em áreas ruderais como beira de estradas e terrenos baldios (MACHADO et al., 2008), apresentando, também, uma distribuição na maioria dos ambientes favoráveis à agricultura, desde o continente asiático ao americano (MONDO et al., 2010).

Podemos encontrar várias sinonímias para *Digitaria insularis*, entre elas *Andropogon insularis* L.; *Trichachne insularis* (L.) Nees; *Tricholaena insularis* (L.) Griseb; *Valota insularis* (L.) Chase; *Digitaria insularis* (L.) *Mezex Ekman*; *Panicum leucophaeum* Kunth, in Humb. & Bonpl.; *Acicarpa sacchariflora* Raddi; *Trichachne sacchariflora* Nees; *Digitaria sacchariflora* (Nees) Henrard; *Leptocoryphium penicilligerum* Speg. e *Panicum insulare* (L.) G. Mey. var. sacchariflorum (Nees) Hack. Ex Stuckert. Contudo, o nome científico mais aceito é *Digitaria insularis* por ser o primeiro nome dado a esta espécie, sendo, portanto, o mais antigo (CANTO-DOROW, 2001).

Dentre as características do capim-amargoso, destacam-se a capacidade de formação de rizomas e touceiras, sendo uma espécie de ciclo perene com metabolismo fotossintético do tipo C4, além de produzir sementes com pilosidade que auxiliam em sua dispersão a longas distâncias (CLAYTON et al., 2006; LORENZI, 2008; KISSMANN; GROTH, 1997). Estas características, aliadas ao grande percentual germinativo, faz com que esta espécie tenha alta capacidade de disseminação.

Para evitar as perdas provocadas pelas plantas daninhas devem-se realizar medidas eficientes de manejo desses agentes. Estas medidas de manejo devem ser feitas da forma mais racional possível, integrando medidas culturais, mecânicas e químicas, sendo esta última a que resulta em melhores índices de controle, tornando o método químico de grande utilização (OLIVEIRA Jr.; CONSTANTIN; INOUE, 2011), o que faz com que o manejo de plantas daninhas, em maior parte das culturas, seja realizado através do uso de herbicidas.

O sucesso do manejo químico depende de vários princípios técnicos, como a identificação das espécies a serem controladas, a cultura com a qual vão competir e a tecnologia de aplicação utilizada (OLIVEIRA Jr.; CONSTANTIN; INOUE, 2011; SILVA et al., 2007). Geralmente, um mesmo herbicida não apresenta espectro de ação suficiente para controlar todas as espécies existentes na área a ser cultivada (BRIGHENTI et al., 2003; ERASMO et al., 2004), o que requer a adoção de outras técnicas de manejo ou o uso de outros herbicidas. O glyphosate é um herbicida de ação não seletiva e sistêmica que é absorvido preferencialmente pelas folhas em um processo bifásico onde ocorre uma rápida penetração inicial da cutícula seguida por uma absorção simplástica lenta, sendo este processo influenciado pelas características da planta, condições ambientais, concentração do herbicida, surfatante utilizado e método de aplicação (MONQUERO et al., 2004; CASELEY; COUPLAND, 1985; FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Contudo, para Galli e Montezuma (2005), o glyphosate é um produto de uso bastante diversificado, que é utilizado de forma isolada e que vem sendo utilizado de forma indiscriminada no meio agrícola por mais de trinta anos. O uso intensivo deste herbicida fez com que as comunidades de plantas daninhas dos agroecossistemas desenvolvessem mecanismos de resposta na flora específica ou seleção de certos biótipos resistentes nas populações de plantas daninhas (LOPEZ-OVEJERO, 2006). Este

fator é oriundo da variabilidade genética dos organismos vivos, sendo uma forma de adaptação e sobrevivência da espécie contra fatores presentes no ambiente. Assim, o herbicida é o agente que impõem a pressão de seleção sobre uma determinada população de plantas daninhas, selecionando indivíduos resistentes (CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

Os conceitos de tolerância e resistência ainda não são bem compreendidos sendo eles dois mecanismos de sobrevivência distintos (OLIVEIRA Jr.; CONSTANTIN; INOUE, 2011). Isso porque a tolerância é uma característica inerente à determinadas espécies de plantas daninhas, antes mesmo da primeira aplicação de um determinado herbicida, o que torna estas espécies não controladas pelo mesmo. Segundo Christoffoleti et al. (2008), a tolerância, assim como a suscetibilidade são características inatas das espécies, que consiste em sobreviver ou não à aplicação de determinado herbicida; com ou sem alterações marcantes em seu desenvolvimento vegetativo.

O conceito de resistência de plantas daninhas a herbicidas é definido por Heap e LeBaron como a capacidade evoluída de uma população previamente suscetível a um herbicida, de sobreviver e completar seu ciclo de vida após a aplicação do mesmo em sua dose recomendada em condição de campo (HEAP, 2015). A Weed Science Society of America define este conceito como sendo a habilidade adquirida de uma planta sobreviver e se reproduzir após a aplicação de uma dose de herbicida normalmente letal para seu biótipo selvagem, sendo que esta resistência pode ocorrer naturalmente ou ser induzida através de técnicas de engenharia genética ou seleção de variantes produzidas por cultura de tecidos ou mutagênese (WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA - WSSA, 2015). Outra definição de Christoffoleti et al. (2008), López-Ovejero (2006) e Monquero (1999), a resistência de plantas daninhas aos herbicidas é caracterizada por uma redução na resposta de uma população ao uso destes agroquímicos. O uso repetitivo da dose recomendada gera uma pressão de seleção para biótipos resistentes, que normalmente encontram-se em baixa freqüência na população.

De acordo com o website “International Survey of Herbicide Resistant Weeds” (HEAP, 2015) as plantas daninhas desenvolveram resistência a 22 dos 25 sítios de ação onde herbicidas, totalizando 156 diferentes herbicidas oriundos de 447 casos

únicos (espécie x sítio de ação) relatados de plantas daninhas resistentes à herbicidas no mundo, sendo 244 espécies diferentes dentre as quais 142 são dicotiledôneas e 102 são monocotiledôneas.

Mundialmente foram identificadas 32 espécies de plantas daninhas resistentes ao herbicida glyphosate, relatadas em 17 países diferentes sendo os Estados Unidos da América, Austrália, Brasil, Espanha e Argentina onde se encontram maior número de casos (HEAP, 2015).

A resistência ao glyphosate foi constatada no Brasil pela primeira vez para a espécie Azevém (*Lolium multiflorum*), no Sul do país (ROMAN et al., 2004). Em seguida identificaram-se mais duas espécies resistentes, pertencentes ao mesmo gênero e muito similiares morfologicamente, sendo as espécies de buva, *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Conyza sumatrensis* (MOREIRA et al., 2007; LAMEGO; VIDAL, 2008; HEAP, 2015). A partir do ano de 2009, identificou-se o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate (CHRISTOFFOLETI et al., 2009; NICOLAI et al., 2010; ADEGAS et al., 2010; CARVALHO, 2011) e mais recentemente, o capim branco (*Chloris elata*) (BRUNHARO, 2014) e caruru palmer (*Amaranthus palmeri)* (CARVALHO et al., 2015) também resistente ao mesmo herbicida.

Em países como os Estados Unidos da América onde a resistência de plantas daninhas à herbicidas está disseminada em grandes áreas e presente em diversas espécies, existem pesquisas e recursos alocados para o mapeamento e monitoramento de áreas com a presença de populações resistentes a herbicidas. Este plano de monitoramento e mapeamento permite a detecção de resistência em baixas frequências, o que ajuda a direcionar o manejo pró-ativo das populações de espécies resistentes para os agricultores e profissionais em outras regiões como um meio de fornecer um sistema de alerta para enfrentar o problema de resistência em plantas daninhas (DAVIS et al., 2008). No Brasil o monitoramento e mapeamento de plantas daninhas resistentes a herbicidas ainda não foi desenvolvido, o que torna este trabalho pioneiro no país.

Com isso o objetivo principal deste trabalho foi (i) determinar uma dose discriminatória entre os biótipos de capim-amargoso resistentes e suscetível ao gyphosate, e mapear parte das regiões do Brasil onde existem relatos sobre populações desta espécie resistentes ao glyphosate; (ii) testar alternativas de

controle químico para o controle do biótipo resistente utilizando herbicidas recomendados para as culturas do milho e algodão, (iii) elucidar os mecanismos de resistência ao glyphosate comparando biótipos resistentes de diferentes regiões com um padrão suscetível e; (iv) averiguar a possibilidade de transferência de genes de resistência para gerações futuras através de cruzamentos com biótipos suscetíveis ao glyphosate.

Referências

ADEGAS, F.S.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E.; OSIPE, R. Diagnóstico da existência de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate no sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Resumos..**. Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 162.

BRUNHARO, C.A.C.G. **Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris Polydactyla*) ao herbicida glyphosate.** 2014. 153 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C.; GAZZIERO, D.L.P.; ADEGAS, F.S.; VOLL, E. Cadastramento fitossociológico de plantas daninhas na cultura de girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 38, n. 5, p. 651-657, 2003.

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

CARVALHO, L.B. **Interferência de *Digitaria insularis* em *Coffea arabica* e respostas destas espécies ao glyphosate.** 2011. 118 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

CARVALHO, S.J.P.; GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CAVENAGHI, A.L.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Detection of glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of mato grosso, Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 579-586, 2015.

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

CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; DIAS, A.C.R.; MELO, M.S.C.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F; GALLI, A.J. Avaliação da suspeita de resistência de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao herbicida glyphosate em pomares cítricos no Estado de São Paulo - Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGIA, 22.; CONGRESSO DA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS, 19.; CONGRESS IBEROAMERICANO DE CIÊNCIA DE LAS MALEZAS, 2., 2009, Lisboa. **Resumos…** Lisboa: Fundação Calouste Glubenkian, 2009. p 533-536.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LOPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S.J.P.; CATANEO, A.C.; CARVALHO, J.C.; MOREIRA, M.S. **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. 120 p.

CLAYTON, W.D.; VORONTSOVA, M.S.; HARMAN, K.T.; WILLIAMSON, H.; **Grass base:** the online world grass flora. 2006. Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Acesso em: 13 mar. 2015.

DAVIS, V.M.; GIBSON, K.D.; JOHNSON, W.G. A field survey to determine distribution and frequency of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Indiana. **Weed Technology**, Lawrence, v. 22, n. 2, p. 331-338, 2008.

ERASMO, E.A.L.; Potencial de espécies utilizadas como adubo verde no manejo integrado de plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 337-342, 2004.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **Glyphosate:** a unique global herbicide. Washington: American Chemical Society, 1997. , v. 1, 653 p.

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

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds.** Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 10 mar. 2015.

KISSMANN, K.G. ; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1997. v.1 p. 510-513,

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F. **Resistência de populações da planta daninha *Digitaria ciliaris* (Retz.) Koel. a herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase)**. 2006. 101 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 2008. 495 p.

MACHADO, A.F.L.; MEIRA, R.M.S.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; TUFFI SANTOS, L.D.; FIALHO, C.M.T.; MACHADO, M.S. Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de Digitaria insularis. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

MONDO, V.H.V.; CARVALHO, S. J. P.; DIAS, A. C. R.; MARCOS FILHO, J. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1, p.131-137, 2010.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OSUNA, M.D.; DE PRADO, R.A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MONQUERO, P.A. **Biologia, manejo e caracterização bioquímica e genética de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS).** 1999. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de Sáo Paulo, Piracicaba, 1999.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistencia de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

NICOLAI, M.; MELO, M.S.C.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. ; CHRISTOFFOLETI, P.J. Monitoramento de infestações de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suspeitas de resistência ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2., 2010, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 200.

OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Ed. Omnipax, 2011. 348 p.

PITELLI, R.A.; Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, p. 16-27, 1985.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 301-306, 2004.

SILVA, A.A.; FERREIRA, A.F; FERREIRA, L.R.; SANTOS J.B. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A.A. da; SILVA, J.F. da. (Ed.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas.** Viçosa: Ed. UFV, p. 1-62, 2007.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Resistance and tolerance definitions. **Weed Technology**, Lawrence, v. 12, p. 789, 1998._. Disponível em: <http://www.wssa.net>. Acesso em: 10 mar. 2015.

2 DISTRIBUIÇÃO E FREQUÊNCIA DAS POPULAÇÕES RESISTENTES DE CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) AO GLYPHOSATE EM REGIÕES AGRÍCOLAS DO BRASIL

Resumo

A ocorrência de populações resistentes de plantas daninhas ao glyphosate vem sendo observada em todos os sistemas de produção baseados em aplicações repetitivas deste herbicida. No Brasil, as espécies resistentes ao glyphosate que aparecem frequentemente nestas áreas são a buva (*Conyza bonariensis, C. sumatrensis* e *C. Canadensis*), capim branco (*Chloris elata)*, caruru palmer (*Amaranthus palmeri*) e capim-amargoso (*Digitaria insularis*), tendo este último se disseminado por praticamente toda região agrícola do país. Assim, o mapeamento de sua ocorrência nas regiões agrícolas do país se torna necessário para alertar as regiões produtoras e implementar o manejo integrado reduzindo esta disseminação. Desta forma, foi desenvolvida a presente pesquisa objetivando mapear a distribuição e frequência de ocorrência do capim-amargoso em algumas regiões agrícolas do Brasil que apresentam populações resistentes ao glyphosate. Para isso foram coletadas sementes de populações de capim-amargoso de áreas agrícolas das regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil onde foram observadas falhas no controle de *D. insularis* pelo glyphosate. Inicialmente curvas de dose-resposta foram desenvolvidas, utilizando biótipos suscetíveis, a fim de determinar a dose de triagem utilizada para diferenciar as populações resistentes das suscetíveis. Para isso, os biótipos foram semeados em vasos plásticos de 1,0 L contendo substrato comercial, e após a emergência foi realizado um desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ – USP, e conduzidas até o estádio de 2 a 3 perfilhos. Para obtenção das curvas de dose-resposta utilizou-se nos ensaios sete doses de glyphosate: 120, 240, 480, 960, 1.920, 3.840 e 7.680 g e.a. ha^{-1}, bem como a testemunha sem aplicação do herbicida. Realizaram-se avaliações visuais de controle (C) e pesagem da massa seca (GR). O delineamento experimental adotado para os experimentos foi completamente casualizado, com quatro repetições. Os dados finais foram avaliados no modelo de curva de dose-resposta do programa estatístico R, resultando na dose discriminatória de triagem de 960 g e.a. ha^{-1}. O mapeamento indicando a presença ou ausência de populações resistentes ao glyphosate foi realizado baseando-se no controle visual e pesagem da massa seca aos 28 dias após a aplicação da dose discriminatória. Das populações de capim-amargoso analisadas nas regiões oeste do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul e partes dos Estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso verificou-se a presença de populações resistentes, evidenciando que nestas regiões há necessidade urgente dos produtores adotem medidas químicas imediatas de manejo, alternativas ao Glyphosate. Caso estas medidas não sejam adotadas é de se esperar que ocorram perdas de produtividade. Já para os produtores onde foram detectados biótipos suscetíveis, ou seja, não houve ainda seleção de biótipos resistentes ao glyphosate em suas áreas, é necessário também que medidas alternativas sejam adotadas de forma preventiva. Esta recomendação está baseada no fato que a presença do biótipo resistente na região, aliada a alta capacidade dispersiva da planta daninha poderá também ser um problema no futuro para estes

produtores, caso não sejam pró-ativos na prevenção da resistência em suas áreas de produção.

Palavras-chave: Resistência; Dose discriminatória; Mapeamento; Prevenção; Manejo

Abstract

Glyphosate weed resistance has been observed in all farming systems based on repetitive applications of this herbicide. The species that often appear in these areas are hairy fleabane (*Conyza bonariensis, C. canadensis* and *C. sumatrensis*), Tall windmill grass (*Chloris elata)*, Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and sourgrass (*Digitaria insularis*), this last species has been spread throughout the agricultural regions of Brazil. Due to this a survey for glyphosate resistant sourgrass in agricultural areas of the country is necessary to direct farmers in order to apply the integrated weed management and reduce it´s spread. Thus, this research was developed in order to map the regions of Brazil which have the presence of glyphosate resistant populations. Seeds were collected from the South, Southeast, Midwest and Northeast regions where it has been detected reduced control of *D. insularis* after glyphosate application. Dose-response curves were developed using susceptible biotypes to determine screening dose used to differentiate resistant from susceptible populations. The samples were sown in 1L plastic pots containing potmix and after emergence, the plants were thinned leaving only two plants per pot. The experiment was conducted in the greenhouse of the Department of Plant Production of ESALQ - USP, where the plants grew until the 2-3 tillers stage. For the dose-response curves experiment the herbicide treatments consisted of seven glyphosate doses: 120, 240, 480, 960, 1920, 3840, 7680 g.a.e. ha^{-1} and the untreated check. Visual assessments of control (C) and dry matter weighing (GR) were conducted 28 days after application. The experimental design adopted for the experiments was completely randomized with four replications. The data was evaluated in the R statistical softaware using the dose-response curve model, resulting in a screening dose of 960 g.a.e. ha^{-1}. The mapping indicating the presence or absence of glyphosate resistant populations was created based on the visual control and dry weight assessments, 28 days after application of the screening dose. The sourgrass populations analyzed in western Parana, southern Mato Grosso do Sul and parts of São Paulo, Goiás, Minas Gerais and Mato Grosso states had resistant populations, indicating that in these areas farmers urgently need to adopt chemical management, alternative to Glyphosate. If these measures are not adopted it may occur yield losses. As for the areas in which susceptible biotypes have been detected, the adoption of alternative measures it is also necessary, to prevent glyphosate resistance selection. This recommendation is based on the presence of the resistant biotype in the region, combined with sourgrass high seed dispersion, which may result in a future problem for these farmers, if they are not proactive in preventing resistance in their fields.

Keywords: Resistance; Screening Dose; Mapping; Prevention; Management

2.1 Introdução

O glyphosate é o herbicida importante utilizado globalmente em áreas de plantio direto, ou culturas perenes, por ser não seletivo de amplo espectro de controle e de baixo custo (GALLI; MONTEZUMA, 2005; DUKE; POWLES, 2008). O glyphosate interrompe a via do chiquimato, inibindo especificamente a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980). Todavia, sua intensa utilização resulta em grande pressão de seleção dentro das populações de plantas daninhas suscetíveis ao herbicida, podendo assim selecionar biótipos resistentes a ele (CHRISTOFFOLETI et al., 2009), fenômeno esse observado em praticamente todas as regiões do mundo onde o glyphosate é usado intensivamente (HEAP, 2015).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004; WSSA, 1998). Este processo é um fenômeno amplamente disseminado, apesar de alguns mecanismos de ação parecerem ser mais afetados do que outros, como são os casos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS e ACCase, quando comparados com os casos de resistência aos herbicidas inibidores da EPSPs (HEAP, 2015; CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

A resistência de plantas daninhas ao glyphosate foi inicialmente considerada improvável de evoluir na natureza, com base nos fatos de que a seleção intencional para tolerância a este herbicida, utilizando plantas inteiras e cultura de tecidos, foi mal sucedida e os mutantes gerados em laboratório que possuíam a EPSPs altamente resistente apresentaram cinética enzimática indesejável (BRADSHAW et al., 1997; revisados por PLINE-SRNIC, 2006). O não surgimento de resistência ao glyphosate parecia ser verdadeiro por não ter sido encontrado durante os primeiros 15 anos de uso como herbicida não seletivo. No entanto, a utilização intensiva de glyphosate para controlar um grande número de plantas daninhas em grandes áreas, especialmente depois da introdução de plantas transgênicas resistentes ao glyphosate, impôs alta pressão de seleção sobre as plantas daninhas, resultando na evolução da resistência ao glyphosate em populações de 32 espécies até o momento (HEAP, 2015).

Apesar do número de espécies ainda não ser tão expressivo, a área em que estas espécies estão presentes tende a crescer com o alto número de aplicações em jato dirigido em culturas perenes ou em área total em culturas resistentes ao glyphosate, aliado aos 30 anos de utilização da molécula na agricultura (DUKE; POWLES, 2008).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma espécie perene, herbácea, entoucerada, ereta, rizomatosa, de colmos estriados, com 50 a 100 cm de altura (LORENZI, 2008; KISSMANN; GROTH, 1997), e altamente competitiva. O capim-amargoso apresenta em suas sementes estruturas especializadas de disseminação pelo vento, sendo assim, é uma planta que atualmente ocorre em todo o Brasil, possibilitando assim a disseminação dos biótipos resistentes.

A frequente utilização de glyphosate ao longo dos anos, especialmente em áreas cultivadas com culturas tolerantes ao herbicida, gerou uma grande pressão de seleção sobre populações de *Digitaria insularis* presentes em áreas agrícolas dos Estados produtores de grãos e culturas perenes.

Tendo em vista todos os aspectos biológicos e condições de manejo descritas anteriormente, faz com que alguns agricultores possam acreditar que a maior tolerância ao glyphosate em plantas de *Digitaria insularis* após a perenização, seja devido a resistência ao herbicida, em função da existência de populações com diferentes níveis de tolerância (CORREIA et al., 2010) e do aumento crescente na dose de glyphosate necessária para o controlar o capim-amargoso ao longo de seu desenvolvimento (MELO, 2011).

Existem vários métodos para a detecção da resistência a herbicidas (BECKIE et al., 2000). Ensaios de campo e estufa, como curvas de dose-resposta, utilizando a planta inteira são os mais utilizados e precisos, porém demandam tempo e espaço quando existe grande quantidade de populações a serem estudadas. Assim, a aplicação de uma dose recomendada, que aqui chamamos de discriminatória, em um determinado estádio de desenvolvimento da planta daninha alvo é uma boa alternativa para indicação da existência da resistência ao comparar as avaliações com plantas oriundas de uma população suscetível já conhecida. Contudo o herbicida glyphosate apresenta uma grande variação em sua recomendação em função do estágio de desenvolvimento e espécie de planta daninha a ser estudada (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

Em países como os Estados Unidos da América onde a resistência de plantas daninhas à herbicidas está disseminada em grandes áreas e presente em diversas espécies, existem pesquisas e recursos alocados para o mapeamento e monitoramento de áreas com a presença de populações resistentes a herbicidas. Este plano de monitoramento e mapeamento permite a detecção de resistência em baixas frequências, o que ajuda a direcionar o manejo pró-ativo das populações de espécies resistentes para os agricultores e profissionais em outras regiões como um meio de fornecer um sistema de alerta para enfrentar o problema de resistência em plantas daninhas (DAVIS et al., 2008). No Brasil o monitoramento e mapeamento de plantas daninhas resistentes a herbicidas ainda não foi desenvolvido, o que torna esste trabalho pioneiro no país.

Com isso o objetivo deste trabalho foi (i) determinar adose discriminatória entre populações resistentes e suscetíveis de capim-amargoso ao glyphosate, através de curvas de dose resposta, em estádio intermediário de desenvolvimento; (ii) mapear parte das regiões agrícolas do Brasil, onde existem relatos sobre populações desta espécie, resistentes ao glyphosate.

2.2 Material e Métodos

Curvas de dose-resposta em casa de vegetação para determinação da dose discriminatória entre populações resistentes e suscetíveis de *Digitaria insularis* ao glyphosate.

O experimento de curvas de dose-resposta foi desenvolvido em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, durante os meses de agosto à outubro de 2012. As aplicações dos tratamentos herbicidas foram realizadas quando as plantas estavam no estágio de 2 a 3 perfilhos. Para aplicação dos tratamentos herbicidas foi utilizado um pulverizador costal pressurizado por CO_2, trabalhando à pressão constante de 2,0 bar, utilizando duas pontas descritas como bicos do tipo leque XR 110.02, espaçados a 0,5 m, aplicando um volume de calda correspondente a 150 L ha^{-1}.

Para cada população, os tratamentos herbicidas foram constituídos de sete doses de glyphosate: 120, 240, 480, 960, 1.920, 3.840, 7.680 g e.a. ha^{-1}, bem como a testemunha sem aplicação do herbicida glyphosate. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e oito tratamentos, somando assim 32 parcelas por população aplicada. A unidade experimental foi representada por um vaso plástico de capacidade para 1,0 L, preenchido com substrato comercial PlantMax normalmente utilizado para o cultivo de hortaliças em ambiente protegido, para onde foram transplantadas as plântulas oriundas das sementeiras preparadas com sete dias de antecedência. A quantidade transplantada foi de uma planta por vaso. As populações utilizadas estão na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Localização geográfica das amostras de populações de *Digitaria insularis*, utilizadas no experimento para determinação da dose discriminatória entre populações resistentes e suscetívies ao glyphosate. Piracicaba, 2015

Letra	Cidade	Região	Latitude (N-S)	Longitude (L - O)
A	Iracemápolis - SP	Sudeste	S 22º 39' 17,1"	O 047º 29' 32,39"
B	Rio das Pedras - SP	Sudeste	S 22º 49' 17,99"	O 047º 35' 54,2"
C	Tupaciguara - MG	Sudeste	S 18º 34' 20,88"	O 048º 49' 54,72"
D	Uberlândia - MG	Sudeste	S 18º 50' 53,22"	O 048º 35' 22,2"
E	Rio Verde - GO	Centro-oeste	S 17º 47' 43,8"	O 050º 52' 9,6"
F	Itumbiara - GO	Centro-oeste	S 18º 18' 59,94"	O 049º 13' 51,36"
G	Bom Jesus de Goiás - GO	Centro-oeste	S 18º 10' 57,48"	O 049º 53' 10,14"
H	Goiatuba - GO	Centro-oeste	S 17º 51' 20,22"	O 049º 13' 20,22"
I	Goiatuba - GO	Centro-oeste	S 17º 50' 3,12"	O 049º 13' 0,54"
J	Piracicaba - SP	Sudeste	S 22º 42' 29,52"	O 047º 37' 41,24"
K	Santa Helena - PR	Sul	S 24º 51' 37"	O 054º 19' 58"
L	Santana de Patos - MG	Sudeste	S 18º 48' 44,9"	O 046º 36' 12,6"
M	Juranda - PR	Sul	S 24º 25' 13"	O 052º 50' 35"
N	Indianópolis - MG	Sudeste	S 18º 57' 8,208"	O 047º 50' 29,328"
O	Presidente Olegário - MG	Sudeste	S 18º 10' 21,2"	O 046º 28' 47,04"
P	Primavera do Leste - MT	Centro-oeste	S 15º 16' 6,96"	O 054º 9' 7,2"
Q	Unaí - MG	Sudeste	S 16º 22' 47,64"	O 047º 3' 9,252"

Após a aplicação dos tratamentos foram realizadas avaliações visuais percentuais de controle aos 7, 14, 21 e 28 dias após os tratamentos, onde 0 representava ausência total de sintomas, e 100, morte da planta. Após a última

avaliação visual de controle foi realizada a coleta da parte aérea das plantas para mensuração de massa seca, após secagem em estufa até peso constante.

Os dados obtidos nos experimentos foram inicialmente submetidos à aplicação do teste F sobre a análise de variância. Em seguida foram ajustados ao modelo de regressão não-linear do tipo logístico no qual as variáveis controle e massa seca foram ajustadas ao modelo proposto por Knezevic et al. (2007), com a equação a seguir.

$$y = d/1 + exp[b\,(log\,x - log\,e)]$$

Em que: y é a variável avaliada, x é a dose do herbicida e “b”, “d” e “e” são parâmetros da curva, de modo que “b” é a declividade da curva, “d” é o limite superior da curva e “e” a dose que proporciona 50% de resposta da variável.

O modelo logístico apresenta vantagens uma vez que um dos termos integrantes da equação é uma estimativa do valor de C50 ou de GR50 (CHRISTOFFOLETI, 2002). O C50 (controle de 50% da população) e o GR80 (redução de 50% do crescimento) são as doses do herbicida que proporcionam 50% de controle ou de redução de massa da planta daninha, respectivamente (CHRISTOFFOLETI, 2002; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). Os resultados para a obtenção de uma média de controle aceitável para utilização como dose base para comparação das populações no experimento de mapeamento foi dada pelo uso do C80 e GR80 (80% de controle) fornecidos pelo modelo estatístico usado no programa R.

Levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate

As sementes da população resistente ao glyphosate utilizada como padrão em toda a experimentação foram coletadas na Fazenda Cambuhy produtora de citrus, localizada em Matão, Estado de São Paulo, coordenadas geográficas 21°37'57"S 48°28'46"W (MELO, 2011). Nesta área foi aplicado glyphosate a 1,440 g e.a. ha^{-1}, antes do florescimento, e a partir das plantas que não foram controladas, foi permitida a produção de sementes e estas foram coletadas e utilizadas para os

ensaios. Notadamente no município de Matão – SP, onde a cultura do citrus ocupa grande percentual das áreas agricultáveis, o que selecionou os indivíduos resistentes (NICOLAI et al., 2010).

As sementes do biótipo suscetível foram coletadas no município de Iracemápolis, Latitude: 22º 34' 38,93" sul - Longitude de 47º 31' 46,41" oeste - Altitude de 605 metros, sendo uma área que não apresentava histórico de aplicação de glyphosate.

As sementes de *Digitaria insularis* que compunham as amostras foram coletadas quando apresentavam grau de maturação adequado, em quantidade mínima de 500 sementes quando possível, em áreas de até um hectare onde os produtores relatavam falhas no controle e escapes, sendo estas acondicionadas em sacos de papel devidamente etiquetados com as informações sobre a origem da amostra e enviadas para o laboratório de plantas daninhas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP).

As amostras estudadas foram coletadas em diversas localidades de Estados das regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste, como mostrado nas Tabelas 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5 respectivamente.

Tabela 2.2 – Localização geográfica das amostras de populações de *Digitaria insularis*, coletadas na região Sul do Brasil, para o levantamento. Piracicaba, 2015 (continua)

Cidade	Número de amostras	Coordenadas	
10 de maio - PR	5	S 24°40'44.63"	O 53°54'53.05"
Alto Piquiri – PR	10	S 24°5'39.65"	O 53°24'43.94"
Anahy – PR	1	S 24°38'43.22"	O 53°8'1.46"
Assis Chateaubrian - PR	16	S 24°24'24.80"	O 53°30'51.94"
Boa esperança – PR	3	S 24°14'49.97"	O 52°47'17.01"
Brasilândia do Sul - PR	25	S 24°11'53.65"	O 53°31'40.91"
Cafelândia - PR	2	S 24°37'9.61"	O 53°19'16.35"
Campo Bonito - PR	1	S 24°55'15.68"	O 53°1'27.85"
Campo Mourão - PR	6	S 24°2'37.16"	O 52°22'41.20"
Ouro verde D´oeste - PR	2	S 24°47'54.77"	O 53°53'20.11"
Cascavel - PR	17	S 24°57'28.00"	O 53°27'34.24"
Catanduvas - PR	2	S 25°12'17.39"	O 53°9'19.20"
Céu Azul - PR	6	S 25°14'18.08"	O 53°46'49.13"
Diamante D´oeste - PR	1	S 24°56'32.40"	O 54°6'20.40"
Engenheiro Beltrão - PR	3	S 23°47'51.01"	O 52°15'58.93"
Foz do Iguaçu - PR	7	S 25°30'58.49"	O 54°35'7.53"
Francisco Alves - PR	4	S 24°6'8.91"	O 53°53'20.11 "
Goioerê - PR	32	S 24°8'49.82"	O 53°5'21.39"
Guaíra - PR	1	S 24°5'2.47"	O 54°15'23.52"
Iguatu - PR	2	S 24°40'57.07"	O 53°4'41.31"
Iporã - PR	9	S 24°0'8.27"	O 53°42'30.83"
Itaipulândia - PR	10	S 25°8'13.55"	O 54°18'2.21"
IV Centenário - PR	3	S 24°16'40.71"	O 53°4'34.99"
Janiópolis - PR	1	S 24°8'26.16"	O 52°46'43.89"
Juranda - PR	1	S 24°24'47.22"	O 52°48'35.42"
Lindoeste - PR	5	S 25°15'36.29"	O 53°34'25.67"
Mamborê - PR	4	S 24°19'1.55"	O 52°31'39.16"
Marechal Cândido Rondon - PR	1	S 24°35'1.29"	O 54°9'0.69"
Mariluz- PR	5	S 24°0'26.74"	O 53°8'52.58"
Medianeira - PR	6	S 25°17'53.30"	O 54°5'41.35"
Mercedes - PR	5	S 24°27'15.35"	O 54°9'44.41"
Missal - PR	15	S 25°5'32.38"	O 54°14'53.44"
Moreira Sales - PR	7	S 24°2'39.11"	O 53°0'23.84"
Matelândia - PR	1	S 25°17'14.43"	O 53°57'14.96"
Nova aurora - PR	11	S 24°31'45.60"	O 53°15'28.63"
Paiçandu - PR	1	S 23°27'24.28"	O 52°2'49.14"
Palotina - PR	9	S 24°16'51.04"	O 53°52'1.87"
Paraná d'oeste - PR	1	S 24°6'31.27"	O 52°53'2.16"
Ramilândia - PR	1	S 25°7'13.11"	O 54°1'41.21"
Rancho alegre d'oeste - PR	12	S 24°17'14.53"	O 52°56'18.60"

Tabela 2.2 – Localização geográfica das amostras de populações de *Digitaria insularis*, coletadas na região Sul do Brasil, para o levantamento. Piracicaba, 2015 (conclusão)

Cidade	Número de amostras	Coordenadas	
Santa Helena - PR	17	S 24°51'32.28"	O 54°20'11.48"
Santa terezinha de itaipú - PR	2	S 25°28'36.72"	O 54°24'44.39"
São Clemente - PR	1	S 24°46'55.26"	O 54°14'5.97"
São Miguel do Iguaçú - PR	20	S 25°20'58.74"	O 54°14'27.63"
São pedro do Iguaçú - PR	1	S 24°56'16.03"	O 53°51'9.54"
São Sebastião da Amoreira - PR	7	S 23°27'40.38"	O 50°43'15.24"
Serranópolis do iguaçú - PR	3	S 25°22'49.41"	O 54°3'8.40"
Sta. Lúcia - PR	3	S 25°24'39.00"	O 53°33'51.50"
Sta. Tereza do Oeste - PR	14	S 25°3'17.24"	O 53°37 '40.53"
Sta. Terezinha de itaipú - PR	16	S 25°28'36.72"	O 54°24'44.38"
Terra roxa - PR	6	S 24°9'42.18"	O 54°5'53.31"
Toledo - PR	17	S 24°43'30.67"	O 53°44'30.67"
Três barras do paraná - PR	5	S 25°25'18.15"	O 53°10'51.60"
Ubiratã - PR	15	S 24°32'25.42"	O 52°59'40.84"
Veracruz do Oeste - PR	8	S 25°3'45.81"	O 53°52'39.28"

Tabela 2.3 – Localização geográfica das amostras de populações de *Digitaria insularis*, coletadas na região Sudeste do Brasil, para o levantamento. Piracicaba, 2015

Cidade	Número de amostras	Coordenadas	
Assís – SP	1	S 22º 40' 7.19''	O 50º 23' 4.35''
Colina – SP	1	S 20º 44' 25.95''	O 48º 30' 24.55''
Iracemápolis – SP	1	S 22º 39' 17.1''	O 47º 29' 32.39''
Matão – SP	1	S 21º 36' 44.4''	O 48º 27' 24.4''
Piracicaba – SP	1	S 22º 42' 29.52''	O 47º 37' 41.24''
Rio das Pedras – SP	1	S 22º 49' 17.99''	O 47º 35' 54.2''
Tupaciguara - MG	1	S 18º 34' 20.88''	O 48º 49' 54.72'
Uberlândia - MG	1	S 18º 50' 53.22''	O 48º 35' 22,2''
Santana de Patos - MG	1	S 18º 48' 44.9''	O 46º 36' 12.6''
Indianópolis - MG	1	S 18º 57' 8.208''	O 47º 50' 29.328''
Presidente Olegário - MG	1	S 18º 10' 21.2''	O 46º 28' 47.04''
Planura - MG	1	S 20º 8' 0.18''	O 48º 41' 47.96''
Unaí - MG	3	S 16°21'34.81"	O 46°54'9.31"
Paracatu - MG	1	S 17°13'32.27"	O 46°52'17.37"
Campo Florido - MG	1	S 19°45'48.80"	O 48°34'19.47"

Tabela 2.4 – Localização geográfica das amostras de populações de *Digitaria insularis*, coletadas na região Centro-oeste do Brasil, para o levantamento. Piracicaba, 2015

Cidade	Número de amostras	Coordenadas	
Amambai - MS	41	S 23°6'29.72"	O 55°13'32.50"
Antônio João - MS	5	S 22°11'21.81"	O 55°57'5.48"
Aral moreira - MS	15	S 22°56'59.02"	O 55°37'38.40"
Bom Jesus de Goiás - GO	1	S 18º 10' 57.48"	O 49º 53' 10.14"
Campo Novo do Parecis - MT	1	S 13°39'32.45"	O 57°53'34.96"
Caarapó - MS	32	S 22°38'14.00"	O 54°49'17.17"
Campo Verde - MT	1	S 15º 30' 26.88"	O 54º 22' 32.64"
Chapada dos Guimarães - MT	1	S 15º 28' 9.6"	O 55º 36' 45"
Coronel Sapucaia - MS	14	S 23°16'35.65"	O 55°31'48.98"
Costa Rica - MS	1	S 18º 11' 17"	O 53º 07' 34"
Cuiabá - MT	1	S 15°36'5.08"	O 56°5'52.41"
Diamantino - MT	1	S 14º 25' 53.57"	O 56º 13' 41.31"
Dourados - MS	14	S 22°13'24.79"	O 54°48'45.18"
Eldorado - MS	6	S 23°47'14.31"	O 54°17'3.42"
Goiatuba - GO	2	S 17º 51' 20.22"	O 49º 13' 20.22"
Iguatemi - MS	1	S 23°25'42.62"	O 54°31'18.46"
Itahum - MS	2	S 22°0'0.00"	O 55°19'60.00"
Itaporã - MS	7	S 22°4'49.79"	O 54°47'37.99"
Itaquiraí - MS	9	S 23°22'0.19"	O 54°7'42.19"
Itumbiara - GO	1	S 18º 18' 59.94"	O 49º 13' 51.36
Jandaia - GO	1	S 17º 16' 46.9"	O 50º 12' 40.2"
Jataí - GO	1	S 17º 50' 2.3"	O 51º 37' 46.2"
Jateí - MS	2	S 22°28'51.95"	O 54°18'30.37"
Juti - MS	10	S 22°51'36.37"	O 54°36'23.86"
Laguna Carapã - MS	21	S 22°33'8.46"	O 55°9'4.94"
Lucas do rio verde - MT	1	S 13º 30' 1.5"	O 58º 47' 30.9"
Morrinhos - GO	1	S 17°43'48.06"	O 49°6'51.47"
Mundo Novo - MS	7	S 23°57'42.48"	O 54°16'51.76"
Naviraí - MS	18	S 23°3'44.20"	O 54°11'59.89"
Ponta Porã-MS	44	S 22°31'23.25"	O 55°43'27.30"
Primavera do Leste - MT	2	S 15º 16' 6,96"	O 54º 9' 7.2"
Rio Verde - GO	2	S 17º 42' 0.01"	O 51º 00' 56.9"

Tabela 2.5 – Localização geográfica das amostras de populações de *Digitaria insularis*, coletadas na região Nordeste do Brasil, para o levantamento. Piracicaba, 2015

Cidade	Número de amostras	Coordenadas	
Teresina - PI	1	S 5°5'31.24"	O 42°48'13.53"
Balsas - MA	1	S 7º 43' 0.78"	O 46º 25' 15.3"
Correntina - BA	2	S 13º 39' 3.36"	O 46º 10' 12.06"
São desidério - BA	6	S 12°21'34.28"	O 44°58'36.17"
Luiz Eduardo Magalhães - BA	4	S 12°5'25.66"	O 45°46'49.86"

O experimento foi desenvolvido em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, durante os meses de outubro à dezembro de 2012. A aplicação de glyphosate na dose de 960 g e.a. ha^{-1} determinada pelo experimento de curvas de dose-resposta para os biótipos suscetíveis ao glyphosate, foi realizada quando as plantas de capim-amargoso estavam no estádio de 2 a 3 perfilhos. Para aplicação do tratamento herbicida foi utilizado um pulverizador costal pressurizado por CO_2, trabalhando à pressão constante de 2,0 bar, utilizando duas pontas descritas como bicos do tipo leque XR 110.02, espaçados a 0,5 m, aplicando um volume de calda correspondente a 150 L ha^{-1}.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, 389 amostras da região Sul, 17 amostras da região Sudeste, 266 amostras da região Centro-oeste e 14 amostras da região Nordeste somando assim 2744 parcelas. A unidade experimental foi representada por um vaso plástico de capacidade para 1,0 L, preenchido com substrato comercial PlantMax para hortaliças, onde foram semeadas as populações das amostras coletadas e conduzidas até o estádio de aplicação. Antes da aplicação foi realizado um desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

Após a aplicação do tratamento foram realizadas avaliações visuais de percentual de controle aos 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento, onde 0 representava ausência total de sintomas, e 100, morte da planta. Após a avaliação de 28 dias após o tratamento controle foi realizada a coleta da parte aérea das

plantas para mensuração de massa seca, após secagem em estufa até peso constante das mesmas. A última avaliação das populações em comparação com as amostras padrão de suscetibilidade e de resistência ao glyphosate foi utilizada para caracterizar as amostras estudadas como resistentes, ou suscetíveis, as quais foram caracterizadas pela sobrevivência das plantas nas repetições. Quando duas ou mais repetições contendo plantas de uma população demonstraram controle insatisfatório, abaixo de 80% (FRANS et al., 1986) aos 28 dias após a aplicação, esta foi classificada como resistente ao glyphosate.

Os resultados foram utilizados para gerar um mapa de cada Estado, com formas geométricas para indicação de suscetibilidade ou resistência ao glyphosate. Essa caracterização foi determinada pela amostra que teve menor controle da região municipal da amostra, o que indica a presença ou ausência de biótipos resistentes. Quando a amostra de um município foi única em seu Estado não foi gerado mapa.

2.3 Resultados e Discussão

Curvas de dose-resposta em casa de vegetação para determinação da dose discriminatória entre populações resistentes e suscetíveis de *Digitaria insularis* ao glyphosate.

Os dados obtidos em casa-de-vegetação após a aplicação das doses de glyphosate sobre as populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) em diferentes populações de indicaram a dose de glyphosate média necessária para controlar a espécie no estágio de 2 a 3 perfilhos, baseados nos dados de controle visual e massa seca estão nas Tabelas 2.6 e 2.7, respectivamente. Os parâmetros da equação que geraram os respectivos resultados encontram-se nas Tabelas 2.8 e 2.9.

Tabela 2.6 – Controle 80% (C80) das populações de *Digitaria insularis*, utilizadas para determinar a dose de glyphosate média, necessária para controlar a espécie no estágio de 2 a 3 perfilhos de uma população suscetível. Piracicaba, 2015

População	***DE 80 (g e.a./ha)**	**Erro Padrão**
A	385,0	37,8
B	813,2	79,1
C	599,7	36,9
D	574,7	30,4
E	693,3	57,3
F	890,2	150,8
G	940,8	131,6
H	726,4	164,8
I	892,4	93,3
J	616,1	68,1
K	1222,8	228,6
L	327,0	34,9
M	311,0	39,85
N	551,2	78,4
O	322,0	24,7
P	756,8	72,2
Q	385,6	38,2
Média	**647,5**	

* DE = Dose estimada da equação para obter 80% de controle. Modelo proposto por Knezevic et. al. (2007), y= d/1+ exp[b (log x - log e)]

Tabela 2.7 – Redução do Crescimento de 80%, baseada em massa seca, (GR80) das populações de *Digitaria insularis*, utilizadas para determinar a dose de glyphosate média, necessária para controlar a espécie no estágio de 2 a 3 perfilhos. Piracicaba, 2015

População	***DE 80 (g.e.a./ha)**	**Erro Padrão**
A	400,3	32,3
B	809,5	64,7
C	686,7	52,5
D	632,0	38,2
E	775,7	61,1
F	950,0	96,2
G	971,0	90,2
H	862,9	74,1
I	930,0	72,9
J	604,5	50,4
K	1120,3	119,9
L	335,2	28,5
M	326,9	32,8
N	529,9	53,7
O	314,8	20,5
P	777,2	59,7
Q	426,7	35,7
Média	**673,7**	

* DE = Dose estimada da equação para obter 80% de redução de massa. Modelo proposto por Knezevic et. al. (2007), y= d/1+ exp[b (log x - log e)]

Tabela 2.8 – Parâmetros da equação de curva de dose-resposta utilizando o controle visual, gerados para as populações de *Digitaria insularis*, utilizadas para determinar a dose de glyphosate média, necessária para controlar a espécie no estágio de 2 a 3 perfilhos. Piracicaba, 2015

População	**b ± EP***	**d ± EP***	**e ± EP***
A	´-2.80290 ± 0,43597	101,03189 ± 2,41965	234,76795 ± 14,90775
B	-3,09261 ± 0,51919	101,17056 ± 2,78952	519,41300 ± 31,03047
C	-5,24541 ± 1,45503	100,28952 ± 2,47416	460,41936 ± 25,07592
D	-5,74931 ± 1,45503	100,16285 ± 2,44612	451,55568 ± 25,72571
E	-3,89473 ± 0,77279	100,45766 ± 2,60979	485,65208 ± 25,18991
F	-2,34873 ± 0,41902	98,91751 ± 3,49724	493,34382 ± 43,15945
G	-2,41856 ± 0,38061	100,17792 ± 3,26320	530,34271 ± 41,21324
H	-7,13512 ± 5,46324	100,35504 ± 2,75786	598,12643 ± 49,10466
I	-4,47948 ± 0,91039	100,05514 ± 2,87247	654,87628 ± 37,95227
J	-2,66673 ± 0,41911	100,94771 ± 2,72173	366,35035 ± 24,31234
K	-1,61565 ± 0,22731	102,53920 ± 3,98141	518,47350 ± 53,38370
L	-2,55863 ± 0,39358	101,17380 ± 2,40240	190,19777 ± 13,02866
M	-2,50419 ± 0,46489	99,88844 ± 2,48448	178,81639 ± 12,53149
N	-2,05229 ± 0,29902	101,10328 ± 2,88726	280,52843 ± 22,67416
O	-4,71074 ± 1,21402	99,26881 ± 2,25355	239,82958 ± 11,30595
P	-2,77091 ± 0,38323	101,90209 ± 2,75463	458,90364 ± 29,81732
Q	-3,64593 ± 0,75424	100,02584 ± 2,40027	263,65111 ± 13,85722

“b” é a declividade da curva, “d” é o limite superior da curva e “e” a dose que proporciona 50% de resposta da variável. *Erro padrão do modelo. Modelo proposto por Knezevic et. al. (2007), y= d/1+ exp[b (log x - log e)]

Tabela 2.9 – Parâmetros da equação de curva de dose-resposta utilizando a massa seca, gerados para as populações de *Digitaria insularis*, utilizadas para determinar a dose de glyphosate média, necessária para controlar a espécie no estágio de 2 a 3 perfilhos. Piracicaba, 2015

População	b ± EP*	d ± EP*	e ± EP*
A	´3,05602 ± 0,52234	99,16255 ± 4,29277	254,31548 ± 16,85089
B	´ 3,09587 ± 0,51437	100,40454 ± 3,33801	517,30270 ± 31,02305
C	´4,05788 ± 1,03537	93,60521 ± 3,33366	487,94074 ± 28,03881
D	´4,72941 ± 1,23108	97,64553 ± 3,22926	471,45201 ± 25,97749
E	´3,64058 ± 0,72313	100,01932 ± 3,16022	530,04002 ± 27,61069
F	´2,18686 ± 0,27755	102,51556 ± 3,53793	503,69520 ± 36,76922
G	´2,40969 ± 0,32200	101,17484 ± 3,41697	546,22026 ± 37,99150
H	´4,67340 ± 0,93028	99,00458 ± 2,69488	641,40712 ± 30,72878
I	´4,09762 ± 0,64834	100,78571 ± 2,72559	662,91023 ± 33,44053
J	´2,88225 ± 0,46182	97,35004 ± 3,88005	373,66426 ± 26,07461
K	´1,74835 ± 0,21529	99,36673 ± 4,01736	506,94743 ± 48,32617
L	´2,64989 ± 0,37056	99,30609 ± 4,46092	198,64977 ± 14,67360
M	´2,37566 ± 0,36146	100,08360 ± 4,39688	182,37400 ± 13,69043
N	´2,08928 ± 0,25857	100,94093 ± 4,20765	272,93271 ± 22,06890
O	´4,49718 ± 1,08412	101,42399 ± 4,21736	231,29693 ± 12,29881
P	´2,73777 ± 0,39433	100,30796 ± 3,68219	468,43291 ± 33,32916
Q	3,26885 ± 0,56495	100,41267 ± 3,95424	279,18753 ± 16,28521

"b" é a declividade da curva, "d" é o limite superior da curva e "e" a dose que proporciona 50% de resposta da variável. *Erro padrão do modelo. Modelo proposto por Knezevic et. al. (2007), y= d/1+ exp[b (log x - log e)]

A determinação da dose discriminatória foi objetivando uma resposta precisa, eliminando a taxa de variação para os biótipos de diferentes localidades. O modelo de curva de dose-reposta gera uma dose x quando se determina um controle desejado, contudo conforme a proximidade dos limites do eixo Y, esta estimativa sofre influência do erro padrão da curva. Portanto para determinar a dose que controlaria 100% das plantas suscetíveis sem inviabilizar o desenvolvimento das plantas resistentes, utilizou-se uma dose correspondente a recomendação de bula (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011) para o produto utilizado neste experimento (Roundup Transorb), que foi 960 g e.a. ha^{-1}. Segundo outras pesquisas com biótipos resistentes ao glyphosate de *Digitaria insularis*, o fator de resistência encontrado variou de 3 a 8 vezes (NICOLAI; LÓPEZ-OVEJERO; CHRISTOFFOLETI, 2010; CORREIA; LEITE; GARCIA, 2010; CARVALHO, 2011; MELO, 2011), o que

caracteriza a dose determinada como eficaz para o controle de biótipos suscetíveis e ineficaz para o controle de biótipos resistentes.

Levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate

Das 686 amostras, o total de regiões municipais estudadas foram 107, levando a obtenção de várias amostras para uma mesma região. De acordo com a metodologia a população que obteve menor controle aos 28 dias após o tratamento, foi a utilizada para determinar a forma geométrica dos pontos marcados, sendo que um círculo indica população suscetível ao glyphosate e um triângulo indica população resistente ao glyphosate. Os mapas gerados estão representados pelas Figuras 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7.

Figura 2.1 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado de São Paulo. Piracicaba, 2015

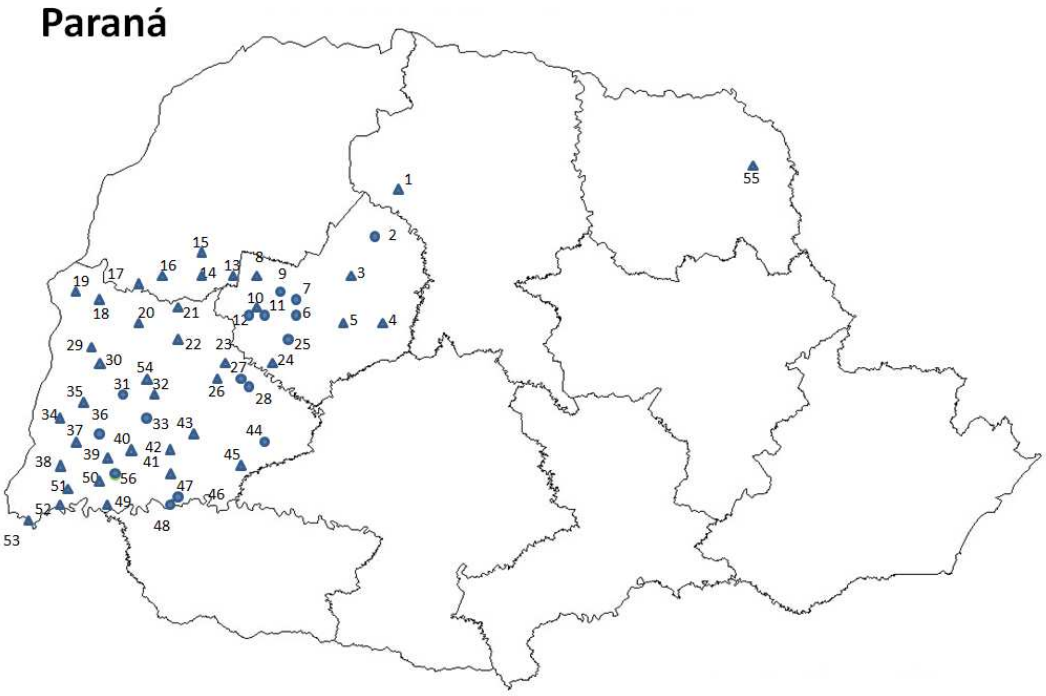

Figura 2.2 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado do Paraná. Piracicaba, 2015

Tabela 2.6 – Legendas para as cidades marcadas no mapa da Figura 2.2. Piracicaba, 2015

Legenda	Cidade	Legenda	Cidade	Legenda	Cidade
1	Paiçandú	**20**	Palotina	**39**	Ramilândia
2	Engenheiro Beltrão	**21**	Brasilândia do Sul	**40**	Vera Cruz do Oeste
3	Campo Mourão	**22**	Assis Chateaubriand	**41**	Céu Azul
4	Luiziana	**23**	Nova Aurora	**42**	Sta. Tereza do Oeste
5	Mamborê	**24**	Ubiratã	**43**	Cascavel
6	Boa Esperança	**25**	Juranda	**44**	Campo Bonito
7	Janiópolis	**26**	Cafélândia	**45**	Catanduvas
8	Moreira Sales	**27**	Anahy	**46**	Três Barras do Paraná
9	Paraná d'Oeste	**28**	Iguatu	**47**	Lindoeste
10	Goioerê	**29**	Mercedes	**48**	Santa Lúcia
11	Rancho Alegre d' Oeste	**30**	Mal. Cândido Rondon	**49**	Serranópolis do Iguaçú
12	Quarto Centenário	**31**	Campo Verde	**50**	Medianeira
13	Mariluz	**32**	Toledo	**51**	São Miguel do Iguaçú
14	Alto Piquiri	**33**	São Pedro do Iguaçú	**52**	Sta. Terezinha do Itaipu
15	Perobal	**34**	Sta. Helena	**53**	Foz do Iguaçú
16	Iporã	**35**	São Clemente	**54**	Dez de Maio
17	Francisco Alves	**36**	Diamante d'Oeste	**55**	São Sebastião
18	Terra Roxa	**37**	Missal	**56**	Matelândia
19	Guaíra	**38**	Itaipulândia		

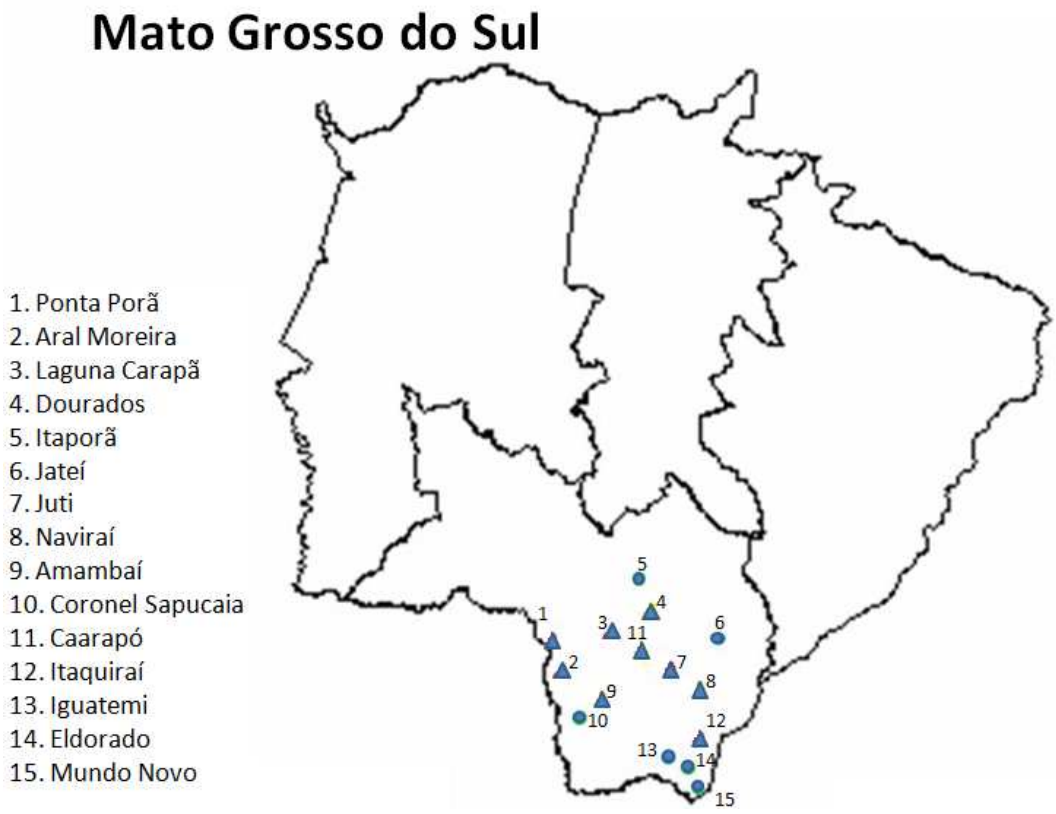

Figura 2.3 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado de Mato Grosso do Sul. Piracicaba, 2015

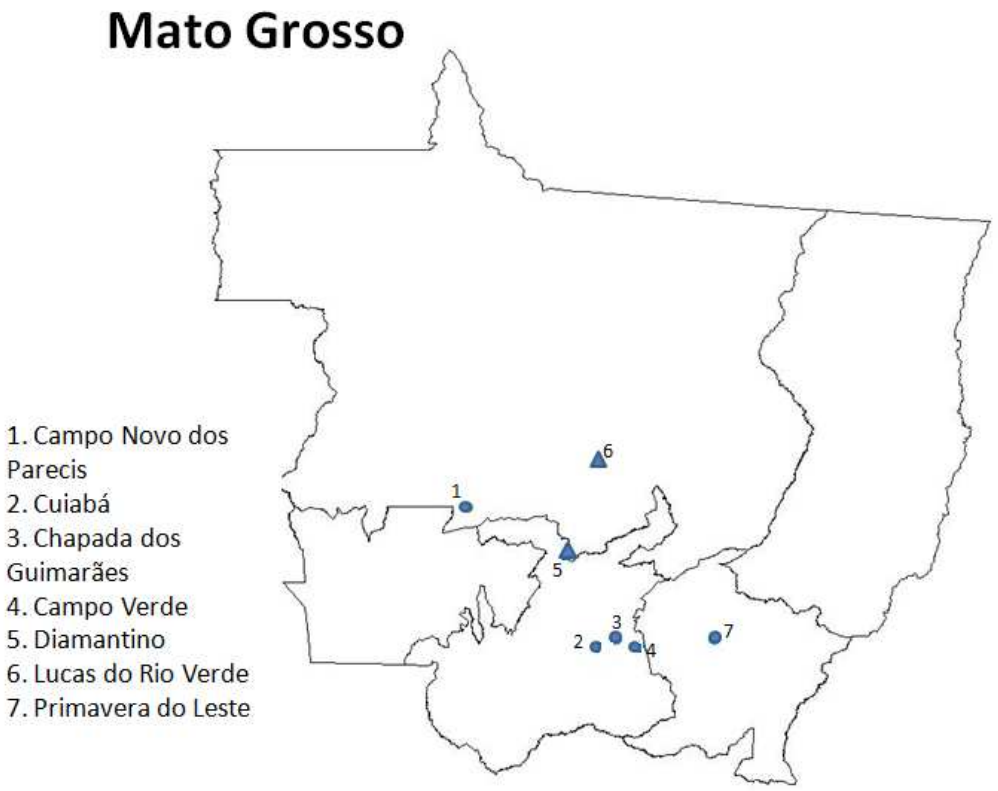

Figura 2.4 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado de Mato Grosso. Piracicaba, 2015

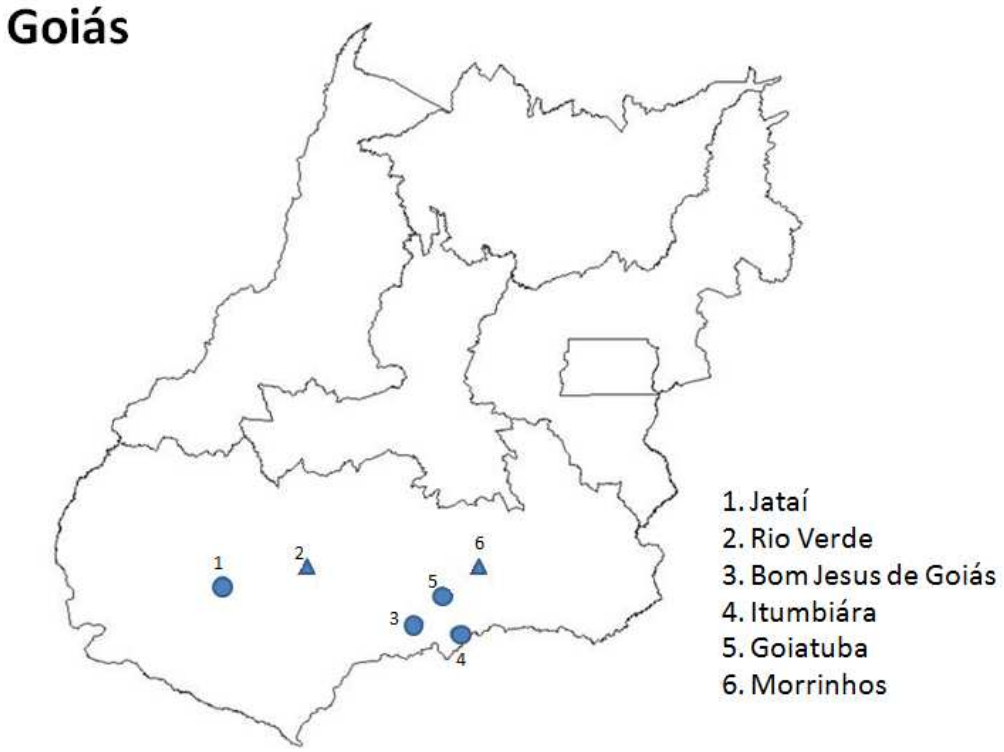

Figura 2.5 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado de Goiás. Piracicaba, 2015

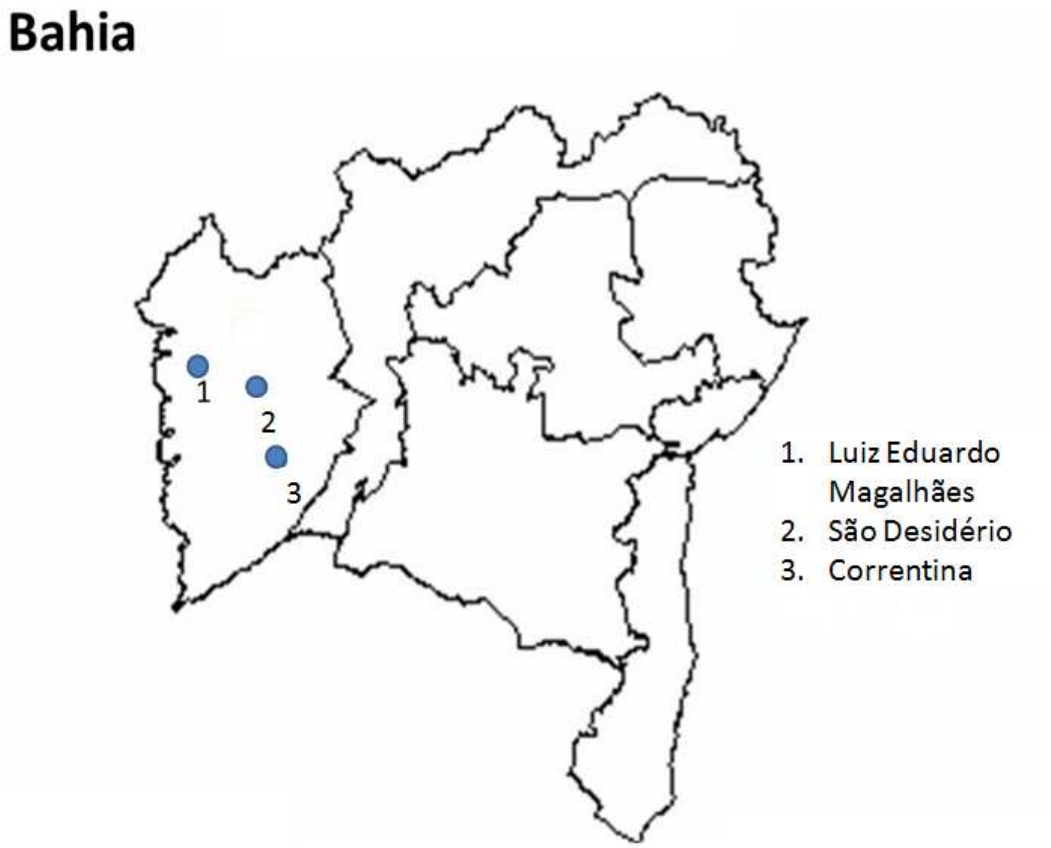

Figura 2.6 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado da Bahia. Piracicaba, 2015

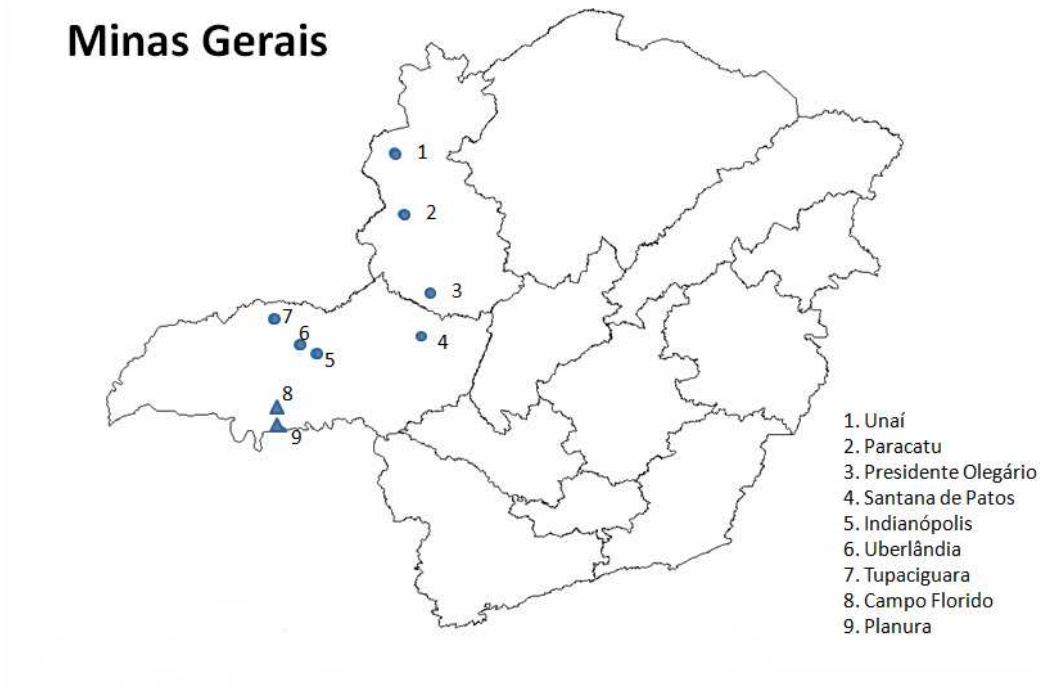

Figura 2.7 – Mapa de levantamento de populações de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate no Estado de Minas Gerais. Piracicaba, 2015

Baseado nos resultados podemos notar que no oeste do Estado do Paraná a resistência de capim-amargoso ao glyphosate, já está estabelecida em 39 regiões municipais, as quais sabidamente passam por uma intensa utilização de glyphosate devido ao sistema de sucessão de culturas baseado nas culturas tolerantes ao glyphosate de soja e milho, o que gera uma alta pressão de seleção nas populações de *Digitaria insularis*. Apesar de existir algumas populações suscetíveis no oeste do Paraná, medidas de prevenção e remediação devem ser recomendadas para evitar que sementes de regiões onde a resistência ao glyphosate está confirmada, se disseminem através do vento, tratores e implementos agrícolas.

Já no Estado de São Paulo, apesar do menor número de populações estudadas, podemos notar que a resistência ao glyphosate encontra-se em 3 regiões municipais Matão, Assis e Colina. A região de Matão tem como sistema produtivo a citricultura, aonde o herbicida glyphosate vêm sendo usado por mais de 25 anos como principal ferramenta de manejo com 5 ou mais aplicações por ano. Já as Regiões de Assis e Colina também são caracterizadas por um sistema de sucessão de culturas, sendo elas a soja e o milho tolerantes ao glyphosate o que

também apresenta um elevado número de aplicações de glyphosate gerando assim uma grande pressão de seleção para ambos os cenários.

No Estado de Minas Gerais as regiões de Planura e Campo Florido apresentaram biótipos resistentes ao glyphosate. No Estado do Mato Grosso do Sul a resistência de capim-amargoso ao glyphosate, já está estabelecida em 9 regiões municipais. No Estado do Mato Grosso, podemos notar uma população resistente na região de Lucas do Rio Verde. Em Goiás foram detectados biótipos resistentes ao glyphosate nas regiões de Morrinhos e Rio verde. Todas as regiões citadas acima, por se tratarem de grandes produtoras de culturas tolerantes ao glyphosate, devem adotar medidas de remediação aos biótipos de *Digitaria insularis* resistentes ao glyphosate utilizando outros herbicidas em associação ao glyphosate a fim controlar estas populações resistentes e evitar a disseminação dos mesmos, seja pelo vento ou por maquinário agrícola ao transitar pelas regiões produtoras de grãos.

Para os Estados da Bahia, Piauí e Maranhão não foram encontrados biótipos resistentes ao glyphosate nas regiões municipais avaliadas, portanto estas regiões devem adotar medidas preventivas de manejo, como a associação de outros herbicidas para o controle de capim-amargoso, tanto em pós como em pré-emergência.

2.4 Conclusões

A dose discriminatória entre as populações de capim-amargoso resistentes e suscetível ao glyphosate é de 960 g e.a.ha^{-1} no estádio de 2 a 3 perfilhos da planta daninha. As populações de capim-amargoso resistentes ao glyphosate já é predominante na região oeste do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul e partes dos Estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso, evidenciando que nestas regiões há necessidade urgente dos produtores adorem medidas químicas imediatas de manejo alternativas ao Glyphosate. Caso estas medidas não sejam adotadas é de se esperar que haverá perdas de produtividade. Já para os produtores onde foram detectados biótipos suscetíveis, ou seja, não houve ainda seleção de biótipos resistentes ao glyphosate em suas áreas, é necessário também que medidas alternativas sejam adotadas de forma preventiva. Esta recomendação está baseada no fato que a presença do biótipo resistente na região, aliada a alta

capacidade dispersiva da planta daninha poderá também ser um problema no futuro para estes produtores, caso não estes produtores não sejam pró-ativos na prevenção da resistência em suas áreas de produção.

Referências

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

BRADSHAW, L.D.; PADGETTE, S.R.; KIMBALL, S.L.; WELLS, B.H. Perspectives on glyphosate resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, p. 189–198, 1997.

CARVALHO, L.B. **Interferência de *Digitaria insularis* em Coffea arabica e respostas destas espécies ao glyphosate**. 118p. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicidas.** 2 ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), p. 3-22, 2004.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LOPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S.J.P.; CATANEO, A.C.; CARVALHO, J.C.; MOREIRA, M.S. **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3 ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. 120 p.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; MOREIRA, M.S.; LOPEZ-OVEJERO, R.F.; CARDINALI, V.C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da EPSPs. In**:** VELINI, E.D.; MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE M.L.B. (Coord.) **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, p 309-356, 2009.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.

CORREIA, N.M.; LEITE, G.J.; GARCIA, L.D. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis*(L.) Fedde ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.4, p.769-776, 2010.

DAVIS, V.M.; GIBSON, K.D. ; JOHNSON, W. G.; A Field Survey to Determine Distribution and Frequency of Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza canadensis*) in Indiana. **Weed Technology**, Lawrence, v. 22, n. 2, p. 331-338, 2008.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 64, n.4, p. 319-325, 2008.

FRANS, R.; TALBERT, R.; MARX, D.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N.D. (Ed.). **Research methods in weed science**. 3.ed. Champaign: Southern Weed Science Society, p.29-46, 1986. p.29-46.

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

HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: **www.weedscience.com**. Acesso em: 10 mar. 2015.

KISSMANN, K.G. ; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1997. v.1 p. 510-513,

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

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**.** 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. p. 495.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

NICOLAI, M.; MELO, M.S.C.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Monitoramento de infestações de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suspeitas de resistência ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS,27., 2010. Ribeirão Preto. **Resumos expandidos...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 943-946.

PLINE-SRNIC, W.; Physiological Mechanisms of Glyphosate Resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 290-300, 2006.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina, 2011. , p. 324-354

STEINRÜCKEN H.C.; AMRHEIN N.; The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Cidade, v. 94, p. 1207–1212, 1980.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Resistance and tolerance definitions. **Weed Technology**, Lawrence, v. 12, p. 789, 1998.

3 ALTERNATIVAS DE CONTROLE QUÍMICO DO CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) RESISTENTE AO GLYPHOSATE, COM HERBICIDAS REGISTRADOS PARA AS CULTURAS DE MILHO E ALGODÃO

Resumo

Nos sistemas de produção agrícolas no Brasil é comum a rotação de culturas soja, milho e/ou algodão, todas resistentes ao herbicida glyphosate; sendo que, estes sistemas estão se tornando cada vez mais comum a seleção de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. Sendo assim, na recomendação de manejo das plantas daninhas requer associação do glyphosate alternativas de controle químico do capim-amargoso. Para a cutura da soja estas alternativas já são relatiavamente conhecidas e estudadas, no entanto, pouco se sabe sobre alternativas para manejo químico com produtos registrados para as culturas de milho e algodão. Dessa forma, torna-se pertinente a investigação da associação de glyphosate com outros herbicidas de mecanismos de ação alternativos, aplicados em condições de pré e pós-emergência, a serem utilizados para o controle eficiente do biótipo resistente ao glyphosate de capim-amargoso (*Digitaria insularis*). O experimento foi desenvolvido no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, em casa-de-vegetação, durante os meses de setembro a dezembro de 2014, utilizando um biótipo de *D. insularis* resistente ao glyphosate. A aplicação aconteceu quando as plantas de capim-amargoso estavam no estádio de 1 a 2 perfilhos e em pré-emergência com diferentes herbicidas. Os tratamentos que obtiveram melhores resultados em condições de pós-emergência da planta daninha foram os herbicidas nicosulfuron, imazapic + imazapyr, atrazine, haloxifop-methyl e tepraloxydim. Os herbicidas atrazine, isoxaflutole, S-metolachlor, clomazone, diuron e flumioxazin se apresentaram como pré-emergentes eficazes para o controle desta espécie.

Palavras-chave: Resistência; Associações; Graminicidas; Pré-emergência; Pós-emergência

Abstract

In cropping systems is common a rotation between soybean, corn and / or cotton, all resistant to glyphosate. In these systems the selection of glyphosate resistant sourgrass populations (*Digitaria insularis*) are becoming more common. Thus, the weed management recommendation requires association of alternative chemical control with glyphosate. Alternative herbicides for the soybean crop have already been studied, however, little is known about alternative chemical control registered for the corn and cotton crops. Thus, it is relevant to investigate herbicides with alternative mode of action, applied in pre and post-emergence conditions, to be used for efficient control of the glyphosate resistant sourgrass biotype (*Digitaria insularis*). The experiment was conducted in Piracicaba, São Paulo State, greenhouse, from September to December of 2014, using a glyphosate resistant *D. Insularis* biotype. The application occurred when sourgrass plants were at the 1 to 2 tillers stage for post-emergent and at pre-emergence for the pre-emergent herbicides. The treatments which showed the best results in postemergence conditions were the nicosulfuron, imazapic + imazapyr, atrazine, haloxyfop-methyl

and tepraloxydim herbicides. Atrazine, isoxaflutole, S-metolachlor, clomazone, diuron and flumioxazin presented themselves as effective pre-emergents for controlling this species.

Keywords: Resistance; Associations; Graminicides; Pre-emergence; Post-emergence

3.1 Introdução

Na agricultura moderna as moléculas de herbicidas vêm substituindo a força humana, animal e mecânica no controle de plantas daninhas em lavouras de forma eficaz, evitando perdas de produtividade das culturas, e assim contribuindo para maior produção global de alimentos (POWLES; YU, 2010).

O glyphosate é um dos herbicidas de grande importância mundial, sendo utilizado por muitos anos no controle de plantas daninhas anuais e/ou perenes em diversos sistemas de produção, principalmente em culturas geneticamente modificadas para tolerância a este herbicida (FAIRCLOTH et al., 2001; BLACKSHAW; HARKER, 2002). Graças ao advento e ampla adoção de culturas geneticamente modificadas, com destaque para soja, milho e algodão resistente ao herbicida glyphosate foi gerada uma nova revolução na agricultura (POWLES; YU, 2010). Este fenômeno resultou na dependência, em alguns países, do glyphosate como principal forma de manejo das plantas daninhas. Todavia, esta tecnologia incrementa o custo para aquisição de sementes, pois beneficia o agricultor permitindo-o utilizar um produto de amplo espectro de controle, ajustável a diferentes estádios de desenvolvimento das espécies daninhas alvo, baixa volatilidade (WEBSTER; SOSNOSKIE, 2010) e que está classificado entre os herbicidas menos tóxicos para animais (DUKE; POWLES, 2008). Estas características relacionadas ao glyphosate e às culturas tolerantes ao mesmo fizeram com que aumentasse sua utilização, o que também pode contribuir significativamente para a seleção de biótipos resistentes em espécies de plantas daninhas (KOGER; REDDY, 2005).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008; WSSA, 1998). A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um fenômeno natural que ocorre espontaneamente em suas populações, não sendo,

portanto, o herbicida o agente causador, mas sim selecionador dos indivíduos resistentes que se encontram em baixa freqüência inicial (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008; DUKE; POWLES, 2008).

Powles e Yu (2010) comparam interessantemente a incapacidade de eliminar doenças em animais, doenças em plantas e pragas através do uso de antibióticos, fungicidas e inseticidas, com o emprego de herbicidas para a eliminação de plantas daninhas do cenário agrícola, devido à atuação de forças evolucionárias sobre a diversidade genética em extensas populações, o que explica a sobrevivência de indivíduos após a aplicação de herbicidas sobre vastas áreas.

Em um estudo realizado nos Estados Unidos da América do Norte com mais de 1.000 agricultores, que cultivam milho, algodão e soja, Frisvold et al. (2009) publicaram que o uso de múltiplos herbicidas com diferentes mecanismos de ação era a prática menos adotada no manejo da resistência, apesar de ser a prática mais difundida entre os especialistas em plantas daninhas. Os relatos mais comuns dos agricultores dos porquês eles não adotavam essa técnica eram os seguintes: (i) alguns produtores acreditam que o uso de mais de um herbicida com mecanismo de ação diferentes aumentava o custo de produção e o controle de plantas daninhas resistentes era incerto (HURTLEY; MITCHELL; FRISVOLD, 2009); (ii) alguns agricultores acreditam que controlar plantas daninhas resistentes está além de suas capacidades (WILSON et al., 2008); (iii) outros agricultores acreditam que a indústria criará novos herbicidas capazes de controlar biótipos resistentes (LLEWELLYN , 2007). Em todos os casos os agricultores estão equivocados.

A dependência do glyphosate desacelerou a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas de herbicidas, porém a alta pressão de seleção imposta pelo uso do glyphosate gerou um processo de selecão de diversos biótipos de espécies de plantas daninhas resistentes no mundo (HEAP, 2015). De acordo com a Céleres Consultoria (2015) no Brasil, safra 2013/2014, 91,1% da soja cultivada no país era resultante de eventos isolados de resistência a herbicidas (84,6%), quanto de eventos múltiplos de resistência a insetos e herbicidas (6,5%). Já para a cultura do milho (safra e “safrinha”) correspondeu a 41,2% de toda a área cultivada no Brasil, e para a cultura do algodão, 30,7% da área cultivada.

Na safra de 2010/2011, segundo Adegas et al. (2012), o número de aplicações média de glyphosate por ciclo da cultura de soja foi de 2,4, onde a dose média foi de

1.584 g e.a. ha^{-1}. Desse total de aplicações, apenas 64,1% teve a adição de outro ingrediente ativo, exemplificando assim a alta dependência do glyphosate no sistema de produção e a baixa adoção de medidas preventivas à seleção de plantas daninhas resistentes ao glyphosate.

O primeiro caso relatado sobre o surgimento de um biótipo de *Digitaria insularis* (capim-amargoso) resistente ao glyphosate, veio do Paraguai, no ano de 2006 (HEAP, 2015). O fato de ser uma planta que pereniza nas áreas agrícolas, produz alta quantidade de sementes e tem um vigoroso desenvolvimento vegetativo (LORENZI, 2008), associado ao fato que o produtor ter aumentado a dose de glyphosate em função da aplicação em estádios tardios de desenvolvimento desta planta daninha, tudo isso eram indicativos do risco desta planta daninha desenvolver resistência ao glyphosate (DUKE; POWLES, 2008; POWLES; YU, 2010).

A intensa utilização de glyphosate aliado à boa adaptabilidade ecológica do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) contribuiu para a seleção de biótipos resistentes dessa espécie. Quando a resistência já se instalou em uma área ou região, como constatado por vários autores (NICOLAI et al., 2010; ADEGAS et al., 2010a; CARVALHO et al., 2011) o estudo sobre as alternativas de controle torna-se vital para garantia do sucesso do manejo de plantas daninhas.

A reintrodução e manutenção da diversidade de estratégias de manejo, como herbicidas alternativos ao glyphosate para o controle de plantas daninhas serão necessárias para impedir ou retardar o surgimento de biótipos resistentes e preservar o glyphosate como uma ferramenta de manejo (POWLES, 2008).

O uso de herbicidas alternativos em associação com o glyphosate para aumento do número de espécies de plantas daninhas controladas em uma mesma aplicação é tradicionalmente realizada nas culturas da soja e algodão (BARROS, 2001; CARVALHO et al., 2002). São poucos herbicidas registrados para o controle de *Digitaria insularis* no Brasil, sendo estes recomendados para aplicação em pré-emergência ou em estádios precoces de desenvolvimento desta espécie (GEMMELI et al., 2012).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar herbicidas alternativos ao glyphosate, eficazes para o controle do biótipo resistente de capim-amargoso (*Digitaria insularis*), para serem utilizados nas culturas de milho e algodão, tanto em condições de pré-emergência da planta daninha, como em condições de pós-emergência inicial.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, com irrigação diária de aproximadamente 4 mm distribuídos durante o dia, no período de setembro a dezembro de 2014, utilizando a população oriunda do município de Campo Florido em Minas Gerais cujas coordenadas geográficas são, Sul 19°45'48.80" Oeste 48°34'19.47".

Para o experimento com herbicidas pós-emergentes as unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos de 1L, preenchidos com substrato adubado onde foram transplantadas uma planta de capim-amargoso por vaso. As plantas se desenvolveram até o estádio de 1 a 2 perfilhos quando foram aplicados os tratamentos herbicidas descritos na Tabela 3.1.

Em áreas onde há uso contínuo de glyphosate, constata-se que plantas originárias de sementes, quando jovens, são controladas facilmente por esse herbicida; contudo, quando elas se desenvolvem e formam rizomas, seu controle é dificultado. Dessa forma, infere-se que o melhor período para controle de *D. insularis* é até os 45 DAE, quando os rizomas ainda não foram formados (MACHADO et al., 2006).

O delineamento estatístico utilizado foi de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo 11 tratamentos herbicidas e uma testemunha sem aplicação.

Tabela 3.1 – Lista de tratamentos herbicidas e doses, aplicados em condições de pós-emergência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) com seus respectivos mecanismos de ação. Piracicaba, 2014

Tratamentos	**Dose (g i.a. ha^{-1})***	**Adjuvante** (Concentração v/v)**	**Mecanismo de Ação**
1- Testemunha sem aplicação	-	-	-
2 – Nicosulfuron[M]	600	Assist a 0,5%	Inibidor da ALS
3 – Mesotrione[M]	192	Assist a 0,5%	Inibidor da HPPD
4 – Tembotrione[M]	100,8	Assist a 0,5%	Inibidor da HPPD
5 - Imazapic + Imazapyr[1M]	52,5 + 17,5	Assist a 0,5%	Inibidor da ALS
6 – Carfentrazone[MA]	12	Assist a 0,5%	Inibidor da PROTOX
7 – Atrazine[M]	3000	Assist a 0,5%	Inibidor do FS II
8 – Flumioxazin[A]	30	Assist a 0,5%	Inibidor da PROTOX
9 - Haloxifop-methyl[A]	60	Assist a 0,5%	Inibidor da ACCase
10 - Trifloxisulfuron-sodium[A]	7,5	Assist a 0,5%	Inibidor da ALS
11 – MSMA[A]	790	Assist a 0,5%	Desconhecido
12 – Tepraloxydim[A]	100	Assist a 0,5%	Inibidor da ACCase

[1] mistura formulada de produtos; *gramas de ingrediente ativo por hectare; **Adição de óleo mineral (adjuvante) segundo recomendação em bula; [M] Herbicida recomendado para a cultura do milho; [A] Herbicida recomendado para a cultura do algodão; [MA] Herbicida recomendado para as culturas do milho e algodão.

Já para o experimento com herbicidas pré-emergentes as unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos de 1L, preenchidos com solo de textura argilosa adubado, cujas características químicas estão descritas na Tabela 3.2 e as físicas na Tabela 3.3, onde foram semeadas 10 sementes de capim-amargoso por vaso. O delineamento estatístico utilizado foi de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo 7 tratamentos herbicidas e uma testemunha sem aplicação especificados na Tabela 3.4.

Tabela 3.2 – Características químicas do solo utilizado no experimento de alternativas de controle com herbicidas pré-emergentes. Piracicaba, 2014

Profundidade	**pH**	**M.O.**	**P**	**K**	**Ca**	**Mg**	**SB**	**CTC**	**V**
(cm)	$CaCl_2$	g dm^{-3}	mg dm^{-3}			$mmol_c$ dm^{-3}			
0-20	6,4	14	17	3	48	18	69,1	87,2	79

Fonte: Departamento de Ciências do Solo. ESALQ/USP

Tabela 3.3 – Propriedades físicas do solo utilizado no experimento de alternativas de controle com herbicidas pré-emergentes (em $g.kg^{-1}$). Piracicaba, 2014

Profundidade (cm)	**Areia**	**Silte**	**Argila**	**Classe textural**	**Origem**
0-20	305	123	572	Argiloso	Piracicaba

Fonte: Departamento de Ciências do Solo. ESALQ/USP

Tabela 3.4 – Lista de tratamentos herbicidas e doses, aplicados em condições de pré-emergência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) com seus respectivos mecanismos de ação. Piracicaba, 2014

Tratamentos	**Dose (g i.a. ha^{-1})***	**Mecanismo de Ação**
1- Testemunha sem aplicação	-	-
2 – Amicarbazone[M]	600	Inibidor do FS II
3 – Atrazine[M]	3.000	Inibidor do FS II
4 – Isoxaflutole[MA]	100,8	Inibidor da HPPD
5 - S-metolachlor[M]	52,5 + 17,5	Inibidor da síntese de ácidos graxos de cadeia longa
6 – Clomazone[A]	12	Inibidor da PROTOX
7 – Diuron[A]	3.000	Inibidor do FS II
8 – Flumioxazin[A]	30	Inibidor da PROTOX

*gramas de ingrediente ativo por hectare; [M] Herbicida recomendado para a cultura do milho; [A] Herbicida recomendado para a cultura do algodão; [MA] Herbicida recomendado para as culturas do milho e algodão.

Os tratamentos herbicidas foram aplicados através de pulverizador costal pressurizado por CO_2, trabalhando a pressão de 30 psi, regulado para uma vazão de 200 L ha^{-1}. A barra de aplicação possuía 2 bicos de aplicação equipados com pontas de pulverização do tipo “leque” XR110:02 VS.

Após a aplicação dos tratamentos herbicidas foram realizadas avaliações percentuais visuais de controle aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) no experimento com herbicidas pós-emergentes e aos 20, 60 e 80 dias após a aplicação (DAA) para o experimento com herbicidas pré-emergentes. As avaliações visuais percentuais têm como referência sendo 0% a ausência total de sintomas e 100% morte da planta, conforme metodologia proposta pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995). Após as últimas avaliações visuais de cada experimento foram coletadas a parte aérea das plantas por vaso, para secagem em estufa de circulação de ar forçada a 60 C, durante dois dias, seguido da pesagem da massa seca.

Para a análise estatística, os dados apresentados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.3 Resultados e Discussão

Na Tabela 3.5 estão representadas as médias de controle da planta daninha capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate, obtidos pela observação dos sintomas oriundos da aplicação dos tratamentos herbicidas descritos no material e métodos. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a média de controle que um herbicida deve promover para ser considerado viável e pleitear um registro junto ao órgão citado é de no mínimo 80% (MAPA, 2015). Conforme preconizado por Frans et al. (1986), o controle de 80% médio de um herbicida sobre uma determinada planta daninha é o mínimo necessário para que esta não mais interfira sobre a cultura de interesse. Dessa forma os tratamentos que obtiveram nota percentual de controle abaixo de 80%, foram considerados como ineficazes.

No experimento com herbicidas pós-emergentes, os tratamentos que obtiveram melhores controles, não diferindo estatisticamente e apresentando médias de

controle acima de 80% aos 35 DAA, foram nicosulfuron 600 g i.a. ha^{-1}, imazapic + imazapyr 52,5+17,5 g i.a. ha^{-1}, atrazine 3000 g ha^{-1}, haloxifop-methyl 60 g ha^{-1} e tepraloxydim 100 g i.a. ha^{-1}. Para a avaliação da massa seca aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, os resultados foram semelhantes aos da avaliação de controle visual (Tabela 3.5), o que fez com que os tratamentos descritos acima se apresentem como boas alternativas de controle químico para o capim-amargoso.

Dornelles et al. (2004) verificaram níveis de controle acima de 85% com a utilização de atrazine, mesotrione e nicosulfuron quando as plantas se encontravam no estádio de 3 a 4 folhas. Já, Adegas et al. (2010b), demonstraram que empregando clethodim, fluazifop-p-buthyl, fenoxaprop-pethyl, tepraloxydim, clethodim+fenoxaprop-pethyl, paraquat, haloxyzafop-methyl e imazapyr em plantas de capim-amargoso com até dois perfilhos é possível obter níveis de controle superiores a 90%.

Os tratamentos que não apresentaram um controle satisfatório aos 35 dias após a aplicação indicam que os mesmos não são recomendandos para a espécie citada no estádio de desenvolvimento utilizado (ANDREI, 2009; MAPA, 2015, RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

Tabela 3.5 - Controle percentual de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) avaliado aos 7, 14, 21, 28 e 45 dias após a aplicação dos tratamentos herbicidas pós-emergentes (DAA), de forma visual e massa seca. Piracicaba, SP, 2014

Tratamentos	**Dose (g.i.a ha^{-1})[1]**	**Avaliações de controle (%) Capim-amargoso (*Digitaria insularis*)**					
		7 DAA**	**14 DAA****	**21 DAA****	**28 DAA****	**35 DAA****	**MS[2]**
1- Testemunha sem aplicação	-	0 c	0 d	0 e	0 d	0 d	20,85 f
2 – Nicosulfuron*[M]	600	50 ab	77,5 ab	88,7 a	98,7	97,5 a	0,34 a
3 – Mesotrione*[M]	192	37,5 b	45 c	50 cd	32,5 c	20 cd	8,19 e
4 – Tembotrione*[M]	100,8	30 bc	50 bc	45 cd	35 c	31,2 bc	5,42 bcde
5 - Imazapic + Imazapyr[3]*[M]	52,5 + 17,5	61,2 ab	86,2 a	93,7 a	98,7	100 a	0,14 a
6 – Carfentrazone*[MA]	12	46,2 ab	48,7 c	30 d	12,5 d	15 cd	7,98 e
7 – Atrazine*[M]	3000	43,7 b	88,7 a	96,2 a	97,5 a	100 a	0,72 abc
8 – Flumioxazin*[A]	30	50 ab	65 abc	63,7 bc	65 b	55 b	2,47 abcd
9 - Haloxifop-methyl*[A]	60	53,7 ab	70 abc	96,2 a	100 a	100 a	0,45 a
10 - Trifloxisulfuron-sodium*[A]	7,5	48,7 ab	47,5 c	53,75 c	42,5 c	32,5 bc	6,89 de
11 – MSMA*[A]	790	78,7 a	62,5ab	52,5 c	37,5 c	27,5 c	5,54 cde
12 – Tepraloxydim *[A]	100	45 b	50 bc	82,5 ab	92,5 a	97,5 a	0,55 ab
DMS[4]		33,01	28,26	20,77	16,63	26,55	4,94
CV (%)[5]		29,27	19,76	13,34	11,28	18,98	40,1

[1] gramas de ingrediente ativo por hectare; [2] Massa seca aos 35 DAA; [3] mistura formulada de produtos; [4] Diferença mínima significativa; [5] Coeficiente de variação; [5]; [M] Herbicida recomendado para a cultura do milho; [A] Herbicida recomendado para a cultura do algodão; [MA] Herbicida recomendado para as culturas do milho e algodão; *Assist 0,5%; ** Dias após a aplicação.

A falha no controle devido ao estádio avançado de desenvolvimento da *Digitaria insularis*, foi verificada também com o uso de mesotrione aplicado em pós-emergência da cultura do milho com intuito de controlar a rebrota de plantas de capim-amargoso. Este herbicida proporcionou controle médio de 70% aos 30 dias após a aplicação, porém não impediu o desenvolvimento do capim-amargoso até o final do ciclo da cultura do milho (TIMOSSI et al., 2009).

Através da análise dos trabalhos desenvolvidos para manejar os biótipos de *D. insularis* resistentes ao glyphosate fica evidente que a utilização pontual de herbicidas inibidores da ACCase em pós-emergência poderá não ser a solução para o problema em todos os estádios de desenvolvimento desta espécie (CORREIA; DURIGAN, 2009; PARREIRA et al., 2010). Também devemos levar em consideração que a dependência do uso de um único mecanismo de ação para o controle do capim-amargoso, especialmente em áreas de resistência ao glyphosate, pode se constituir numa fonte de pressão de seleção para resistência à ACCase (GEMMELI, et al.; 2012).

Os graminicidas utilizados neste trabalho são os herbicidas pertencentes ao mecanismo de ação de inibição da acetil coenzima A (ACCase) (LOPEZ-OVEJERO et al., 2006). Este mecanismo de ação congrega dois grupos químicos, os ariloxifenoxipropionatos, representados pelos herbicidas haloxyfop-methyl, fluazifop-p-butyl e fenoxaprop-p-ethyl e os ciclohexanodionas, com os herbicidas sethoxydim, tepraloxydim e clethodim. Independentemente do controle de *D. insularis*, o graminicidas pertencentes ao mecanismo de ação de inibição da ACCase não tem ação sobre espécies dicotiledôneas (HARWOOD, 1999), o que torna o uso de um graminicida isolado ideal, apenas em áreas cuja infestação é composta exclusivamente por gramíneas, situação esta difícil de ocorrer em áreas agrícolas comerciais extensas e que ocupam diferentes localidades. A estratégia que se visualiza é a associação de graminicidas com o glyphosate.

Portanto, os herbicidas que apresentaram um bom controle neste trabalho podem ter seu efeito potencializado quando usados em aplicações seqüênciais ou em complementação a ação promovida pelo glyphosate. Ronchi et al. (2002) controlou plantas daninhas do gênero *Commelina*, sabidamente de difícil controle pelo glyphosate, através da aplicação seqüencial de paraquat e glyphosate + carfentrazone. Ferreira et al. (2010) avaliaram aplicações seqüenciais do herbicida amônio-glufosinato para o controle da planta daninha buva (*Conyza* spp) resistente ao glyphosate e observaram que o amônio-glufosinato complementou a ação de outros produtos como metribuzin, glyphosate e paraquat. Moreira et al. (2007) também aponta o amônio-glufosinato como alternativa de manejo em associação ao glyphosate.

Com relação à associação entre graminicidas e o glyphosate, Vargas et al. (2005) utilizaram glyphosate e diferentes herbicidas inibidores da ACCase, de forma isolada e em aplicações seqüências, observando que há efeito da ação do glyphosate sobre a capacidade de controle dos graminicidas, tanto sobre biótipos suscetíveis, quanto sobre biótipos resistentes de *L. multiflorum*. Para Vargas et al. (2006) o clethodim é eficaz para o manejo de biótipos de *L. multiflorum* resistentes ao herbicida glyphosate, em estádios de desenvolvimento até o perfilhamento. Lingenfelter e Curran (2007) controlaram a planta daninha *M. frondosa* com o uso de glyphosate e dos graminicidas quizalofop, fluazifop, sethoxydim e clethodim. Barroso et. al. (2014) controlou biótipos de *D. insularis* resistentes ao glyphosate utilizando herbicidas inibidores da ACCase isolados e em mistura com glyphosate, contudo não observou efeito sinérgico para os tratamentos em mistura quando comparados aos graminicidas isolados.

De acordo com Melo et al. (2012), Os tratamentos herbicidas inibidores da ACCase em mistura com glyphosate são alternativas viáveis de controle para o biótipo resistente ao glyphosate de *D. insularis*, porém os herbicidas paraquat + diuron a 400 + 200 g i.a ha^{-1} e amônio-glufosinato a 600 g i.a ha^{-1} utlizados de forma isolada não são viáveis dependendo do estádio da *D. insularis* no momento da aplicação, sendo necessário ser associado ao glyphosate de forma sequencial para obterem bom controle.

Para o controle de *D. insularis* na cultura da soja, com o uso de herbicidas pós-emergentes alternativos ao glyphosate, os herbicidas clethodim, fluazifop-p-buthyl, fenoxaprop-p-ethyl, tepraloxydim, clethodim+fenoxaprop-p-ethyl e haloxyfop-methyl resultaram em controle eficiente em dois estádios de desenvolvimento (ADEGAS et al., 2010b). Adegas et al. (2010b) estudaram o controle de capim-amargoso na cultura da soja com o uso de herbicidas pós-emergentes alternativos ao glyphosate, e constataram que na fase inicial de desenvolvimento do capim-amargoso os herbicidas clethodim, fluazifop-p-buthyl, fenoxaprop-p-ethyl, tepraloxydim, clethodim+fenoxaprop-p-ethyl, paraquat, haloxyfop-methyl e imazapyr resultaram em controle eficaz, e em estádio mais avançado de desenvolvimento, o grupo de tratamentos mais eficaz foi formado por clethodim, fluazifop-p-buthyl, tepraloxydim, haloxyfop-methyl e paraquat.

Os herbicidas inibidores da ACCase, de forma geral, são adsorvidos a matéria orgânica e argilas do solo, já que possuem altos Kow e conseqüentemente Koc

(VIDAL; MEROTTO JR, 2001; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Ainda, todos os inibidores da ACCase sofrem biodegradação no solo, apresentando baixa persistência no ambiente (VIDAL; MEROTTO JR, 2001), o que torna seu efeito residual inexpressivo, necessitando de herbicidas pré-emergentes em mistura para manter um bom controle dos novos fluxos de germinação ao longo do período crítico de prevenção da interferência (PCPI) (PITELLI; DURIGAN, 1984).

Os resultados obtidos pelo experimento com herbicidas alternativos pré-emergentes mostraram que os herbicidas atrazine a 2.500 g i.a. ha^{-1}, Isoxaflutole a 60 g i.a. ha^{-1}, S-metolachlor a 1.440 g i.a. ha^{-1}, clomazone a 1.000 g i.a. ha^{-1}, diuron a 2.000 g i.a. ha^{-1} e flumioxazin a 50 g i.a. ha^{-1} foram eficientes para o controle de *D. insularis* até 80 dias após a aplicação dos mesmos. O herbicida amicarbazone a 280 g i.a. ha^{-1} não apresentou controle satisfatório para o capim-amargoso até os 80 dias após a aplicação.

Tabela 3.6 - Controle percentual de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) avaliado aos 20, 60 e 80 dias após a aplicação dos tratamentos herbicidas pré-emergentes (DAA), de forma visual e pesagem. Piracicaba, SP, 2014

Tratamentos	**Dose ($g.i.a.ha^{-1}$)[1]**	**Avaliações de controle (%) Capim-amargoso (*Digitaria insularis*)**			
		20 DAA*	**60 DAA***	**80 DAA***	**MS[2]**
1- Testemunha sem aplicação	-	0 c	0 c	0 c	13,46 c
2 – Amicarbazone[M]	280	85 b	42,5 b	22,5 b	4,20 b
3 – Atrazine[M]	2500	100 a	100 a	97,5 a	0 a
4 – Isoxaflutole[MA]	60	100 a	83,7	88,7 a	0,41 a
5 - S-metolachlor[M]	1440	100 a	100 a	100 a	0 a
6 – Clomazone[A]	1000	95 ab	97,5 a	98,7 a	0,01 a
7 – Diuron[A]	2000	100 a	100 a	100 a	0 a
8 – Flumioxazin[A]	50	91,3 ab	88,7 a	85 a	0,33 a
DMS[3]		14,96	18,46	19,35	3,46
CV (%)[4]		7,52	10,16	11,01	63,42

[1] gramas de ingrediente ativo por hectare; [2] massa seca aos 80 DAA; [3] Diferença mínima significativa; [4] Coeficiente de variação; * Dias após a aplicação; [M] Herbicida recomendado para a cultura do milho; [A] Herbicida recomendado para a cultura do algodão; [MA] Herbicida recomendado para as culturas do milho e algodão.

A integração entre herbicidas pré-emergentes e pós-emegentes pode resultar em controle mais efetivo das plantas daninhas do que apenas uma aplicação em pós ou apenas uma aplicação em pré-emergência. Jones et al. (2001) chegaram à conclusão de que a aplicação da atrazine em milho resistente a glufosinate durante a semeadura da cultura, complementada pelo amônio-glufosinato para o controle das plantas escapes, resultou em um melhor controle das plantas daninhas do que a aplicação de glufosinate em pós-emergência sem atrazine na semeadura. A aplicação de um herbicida pré-emergente, complementado posteriormente com a aplicação de glyphosate em pós-emergência resulta em maior produtividade e menor presença de plantas daninhas, quando se compara com apenas a aplicação de glyphosate na pós-emergência (Johnson et al.; 2000). Segundo Thomas et al. (2004), o controle de corda-de-viola é incrementado em mais de 27% quando acrescentado um herbicida pré-emergente, em relação a aplicação apenas de glyphosate.

O uso de mais de um mecanismo de ação no controle de uma planta daninha problema é recomendado tanto para evitar o aparecimento de biótipos resistentes como para remediar a seleção já ocorrida, de modo que essa diversificação de modos de ação resulta na redução do banco de sementes do solo (NORSWORTHY et al., 2012).

3.4 Conclusões

Foram determinadas alternativas de controle químico para o biótipo de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate, sendo elas, na pós-emergência da planta daninha no estádio de 1 a 2 perfilhos, os herbicidas Nicosulfuron a 600 g.i.a ha^{-1}, Imazapic + Imazapyr a 52,5 + 17,5 g.i.a ha^{-1}, Atrazine a 3000 g.i.a ha^{-1}, Haloxifop-methyl a 60 g.i.a ha^{-1} e Tepraloxydim a 100 g.i.a ha^{-1}. Os herbicidas Atrazine a 2500 g.i.a ha^{-1}, Isoxaflutole a 60 g.i.a ha^{-1}, S-metolachlor a 1440 g.i.a ha^{-1}, Clomazone a 1000 g.i.a ha^{-1}, Diuron a 2000 g.i.a ha^{-1} e Flumioxazin a 50 g.i.a ha^{-1} se apresentaram como pré-emergentes eficazes para o controle desta espécie.

Referências

ADEGAS, F.S.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E. Soja transgênica resistente ao glyphosate como ferramenta para o manejo de plantas daninhas e produção sustentável. In: VELINI, E.D.; CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; TRINDADE, M.L.B. (Ed.). **Glyphosate**: uso sustentável. Botucatu: FEPAF, 2012. p. 203-213

ADEGAS, F.S.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E.; OSIPE, R. Diagnóstico da existência de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate no sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010. Ribeirão Preto, SP. **Resumos expandidos...**. Ribeirão Preto: SBCPD, 2010a. n.162,

ADEGAS, F.S.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E.; OSIPE, R. Alternativas de controle químico de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27,. Ribeirão Preto, SP. 2010. **Resumos expandidos...**. Ribeirão Preto: SBCPD, 2010b. n.161.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas:** Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 8.ed. São Paulo: Andrei, 2009. p. 1380.

BARROS, A.C. Eficiência da mistura em tanque glyphosate + carfentrazone-ethyl na dessecação de plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Umuarama, v. 2, p. 31-35, 2001.

BARROSO, A.A.M.; ALBRECHT, A.J.P.; REIS, F.C.; FILHO R.V. Interação entre herbicidas inibidores da ACCase e diferentes formulações de glyphosate no controle de capim-amargoso, **Planta Daninha**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 619-627, 2014.

BLACKSHAW, R.E.; HARKER, K.N. Selective weed control with glyphosate in glyphosate-resistant spring wheat (*Triticum aestivum*). **Weed Technology**, Lawrence, v.16, p.885-892, 2002.

CARVALHO, L.B. **Interferência de *Digitaria insularis* em *Coffea arabica* e respostas destas espécies ao glyphosate**. 2011. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista ”Julio de Mesquita” Jaboticabal, 2011.

CARVALHO, F.T.; ALVARENGA, S.L.A.; PERUCHI, M.; PALAZZO, R.R.B. Eficácia do carfentrazone-ethyl aplicado no manejo das plantas daninhas para o plantio direto do algodão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Umuarama, v. 3, p. 104-108, 2002.

CÉLERES CONSULTORIA. **Informativo botecnologia**. Disponível em: <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>.Acesso em: 2 de março de 2015.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas.** 3. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. p. 9-32.

CORREIA, N.M.; DURIGAN, J.C. Manejo químico de plantas adultas de *Digitaria insularis* (L.) Fedde com glyphosate isolado e em mistura com chlorimuronethyl ou quizalofop-p-tefuril em área de plantio direto**. Bragantia**, São Carlos, v. 68, n. 3, p. 689-697, 2009.

DORNELLES, S.H.B.; SANCHOTENE, D. M.; BRONDANI, D.; DEBORTOLI, M. P.; Controle de plantas daninhas do gênero *Digitaria* sp. com o herbicida mesotrione na cultura do milho (*Zea mays*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro. **Resumos...** São Pedro: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, p.107, 2004.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Managenement Science**, West Sussex, v. 64, p.319–325, 2008.

FAIRCLOTH, W.H.; PATTERSON, M.G.; MONKS, C.D.; GOODMAN, W.R. Weed management programs for glyphosate-tolerant cotton (*Gossipium hirsutum*). **Weed Technology,** Lawrence, v.15, p.544–551, 2001.

FERREIRA, C.; OSIPE, J.B.; ALVES, K.A.; SORACE, M.A.; OSIPE, R.; BRITO NETO, A.J. Avaliação da eficiência do herbicida Finale (amônio glufosinato) aplicado na modalidade seqüencial, no controle químico de buva, na operação de manejo em plantio direto, da cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., Ribeirão Preto, SP. 2010. **Resumos expandidos...**. Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. n.233.

FRANS, R.; TALBERT, R.; MARX, D.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N.D. (Ed.). **Research methods in weed science**. 3.ed. Champaign: Southern Weed Science Society, 1986. p.29-46.

FRISVOLD, G.B.; HURLEY, T.M; MITCHEL, P.D. Adoption of best management practices to control weed resistance by corn, cotton, and soybean growers. **Agbioforum**, Columbus, v. 12, p. 370–381, 2009.

GEMELLI, A.; OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P.; JUMES, T.M.C.; NETO, A.M.O.; DAN, H.A.; BIFFE, D.F. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Umuarama, v.11, n.2, p.231-240, 2012.

HARWOOD, J.L. Graminicides which inhibit lipid synthesis. **Pesticide Outlook**, Hemel Hempstead, v.10, p 154-158, 1999.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: www.weedscience.com. Acesso em: 10 mar. 2015.

HURTLEY, T.M.; MITCHELL, P.D.; FRISVOLD, G.B. Weed management costs, weed best management practices, and the Roundup Ready weed management program. **Agbioforum**, Columbia, v. 12, p. 281–290, 2009.

JOHNSON, W.G.; BRADLEY, P.R.; HART, S.E.; BUESINGER, M.L.; MASSEY, R.E. Efficacy and economics of weed management in glyphosate-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 14, p. 57–65, 2000.

JONES, C.A.; CHANDLER, J.M.; MORRISON JR, J.E.; SENSEMAN, S.A.; TINGLE, C.H. Glufosinate combinations and row spacing for weed control in glufosinate-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 15, p. 141–147, 2001.

KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Lakewood, v.53, p.84–89, 2005.

LLEWELLYN, R.S. Information quality and effectiveness for more rapid adoption decisions by producers. **Field Crops Research**, Bonn, v. 104, p. 148–156, 2007.

LOPEZ-OVEJERO, R.F.; PENCKOWSKI, L.H.; PODOLAN, M.J.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas de manejo químico da planta daninha *Digitaria ciliaris* resistente aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura de soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 407-414, 2006.

LINGENFELTER, D.D.; CURRAN W.S. Effect of Glyphosate and Several Accase-inhibitor Herbicides on Wirestem Muhly (*Muhlenbergia Frondosa*) Control. **Weed Technology**, Lakewood, v. 21, n. 3, p. 732-738, 2007.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. p. 672.

MACHADO, A.F.L.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; FIALHO, C.M.T.; TUFFI SANTOS, L.D.; MACHADO, M.S. Análise do crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 641-647, 2006.

MAPA - **Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento** – SISLEGIS, Sistema de Consulta à Legislação. Disponível em: http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal. Acesso em: 26 mar. 2015.

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

MOREIRA, M.S.; MELO, M.S.C.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Herbicidas alternativos para controle de biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v.28, n.1, p. 167-175, 2010.

MOREIRA, M.S.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

NICOLAI, M.; MELO, M.S.C.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Monitoramento de infestações de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suspeitas de resistência ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010. Ribeirão Preto. **Resumos expandidos...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 943-946,

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.; BARRET, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, Lawrence, v. 60, p. 31-62, 2012.

PARREIRA, M.C.; ESPANHOL, M.; DUARTE, D. J.; CORREIA, N. M. Manejo químico de *Digitaria insularis* em área de plantio direto. **Revista Brasileira Ciências Agrárias,** Recife, v.5, n.1, p.13-17, 2010.

PITELLI, R.A.; DURIGAN, J.C. Terminologia para períodos de controle e convivência das plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 15., 1984, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: SBCPD, 1984. p. 37,

POWLES, S.B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**. West Sussex, v. 64, p. 360–365, 2008.

POWLES, S.B; YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Review of Plant Biology,** Palo Alto**,** v. 61, p. 317-347, 2010.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. (Ed.). **Guia de herbicidas**. 6 ed. Londrina: Edição dos autores, 2011. p. 697

RONCHI, C.P. SILVA. A.A.; MIRANDA, G.V.; FERREIRA, L.R.; TERRA, A.A. Misturas de herbicidas para o controle de plantas daninhas do gênero Commelina. **Planta daninha**, Viçosa, MG, v. 20, n. 2, p. 311-318, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina, 1995. p. 42.

TIMOSSI, P.C. et al. Manejo de rebrotes de *Digitaria insularis* (L.) Fedde no plantio direto de milho. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 1, p.175-179, 2009.

THOMAS, W.E.; BURKE, I.C.; WILCUT, J.W. Weed management in glyphosate-resistant corn with glyphosate, halosulfuron, and mesotrione. **Weed Technology**, Lawrence, v. 18, p. 826–834, 2004.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; TOLEDO, R.E.B. Manejo de azevém resistente ao glyphosate em pomares de maçã com herbicida select (clethodim). **Revista Brasileira de Herbicidas**, Passo Fundo, n.1, p. 30 – 36. 2006.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 23, n.1, p. 153-160, 2005.

VIDAL, R.; MEROTTO Jr., A. Herbicidas inibidores da ACCase. In: VIDAL, R.; MEROTTO Jr., A. (Ed.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: UFRS, 2001. p 15-24.

WEBSTER, T.M.; SONOSKIE, L.M. Loss of Glyphosate Efficacy: A Changing Weed Spectrum in Georgia Cotton. **Weed Science**, Lakewood, v.58, p. 73–79, 2010.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Resistance and tolerance definitions. **Weed Technology**, Lawrence, v. 12, p. 789, 1998.

WILSON, R.S.; TUCKER, M.A.; HOOKER, N.H.; LEJEUNE, J.T.; DOOHAN, D. Perceptions and beliefs about weed management: perspectives of Ohio grain and produce farmers. **Weed Technology**, Lawrence, v. 22, p. 339–350, 2008.

4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA PLANTA DANINHA *Digitaria insularis* AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

O conhecimento do mecanismo que confere a uma planta daninha resistência a um determinado herbicida é de fundamental importância tanto sob o aspecto científico e acadêmico, como prático, pois determina as recomendações de prevenção e manejo da resistência no campo. Os estudos existentes até o momento sobre os mecanismos de resistência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao glyphosate existentes na literatura não são conclusivos. Sendo assim, o intuito desta pesquisa foi estudar os mecanismos que conferem resistência aos biótipos de capim-amargoso em sobreviver ao controle pelo glyphosate. Para isso, foi comparada a absorção foliar e translocação do ^{14}C-glyphosate nos biótipos de Matão (R), Campo Florido (MG), Diamantino (MT) e Iracemápolis (S) em função do tempo após sua aplicação. Além disso, também foi estudada a possibilidade do mecanismo de resistência ser resultante de mutação no gene que codifica a EPSPs. Os biótipos S, R, MG e MT absorveram quantidades similares de ^{14}C-glyphosate. Os biótipos R, MG e MT não apresentaram diferenças de translocação de ^{14}C-glyphosate quando comparados com o biótipo S. O sequenciamento do gene que codifica a EPSPs mostrou não haver mutação nas regiões 106 e 182, normalmente resposáveis por mutações que conferem resistência em outras espécies ao glyphosate. Nenhuma mutação no gene que codifica a EPSPs foi observada. Concluindo-se que estes não são os mecanismos de resistência ao glyphosate para os biótipos avaliados.

Palavras-chave: Absorção; Translocação; Mutação; ^{14}C-glyphosate; Capim-amargoso

Abstract

Knowledge of the mechanism which confers weed resistance to a particular herbicide is extremely important both from a scientific, academic aspect and practical aspect as well, because it determines recommendations for preventing and managing resistance in the field. Existing studies to date on the glyphosate resistance mechanisms of sourgrass (*Digitaria insularis*) are not conclusive. Therefore, the objective of this research was to study the mechanisms which confer glyphosate resistance to *Digitaria insularis* biotypes. ^{14}C-glyphosate foliar uptake and translocation in biotypes from Matão (R) Campo Florido (MG), Diamantino (MT) and Iracemápolis (S) was assessed during time periods after application. Furthermore, the putative mutation in the gene which encodes EPSPs was also studied for the S and R biotypes. Biotypes S, R, MG and MT absorbed similar amounts of ^{14}C-glyphosate. Biotypes R, MG and MT showed no differences in ^{14}C-glyphosate uptake or translocation when compared with S biotype. The Sequencing of the gene encoding EPSPs showed no mutation in the region 106 or the region 182 for the biotype R. As a result of this research we can conclude that reduced uptake or

translocation and EPSPs mutation, were not the glyphosate resistance mechanisms for the evaluated biotypes.

Keywords: Absorption; Translocation; Mutation; ^{14}C-glyphosate; Sourgrass.

4.1 Introdução

O controle químico das plantas daninhas por meio da aplicação de herbicidas é uma prática frequente e constante em áreas agrícolas, devido a sua alta eficácia. Contudo, agricultores nem sempre utilizam esta ferramenta de forma adequada, aliando-a a outros métodos de controle ou utilizando moléculas com diferentes mecanismos de ação, o que resultaria em um manejo integrado das plantas daninhas (POWLES, 2008; LOPEZ-OVEJERO, et al., 2006). Geralmente, um mesmo herbicida não apresenta espectro de ação suficiente para controlar todas as espécies existentes na área a ser cultivada (BRIGHENTI et al., 2003), o que requer a adoção de outras técnicas de manejo ou o uso de outros herbicidas. Contudo, para Galli e Montezuma (2005), o glyphosate é um produto de uso bastante diversificado, que vem sendo utilizado de forma indiscriminada no meio agrícola por mais de trinta anos. O uso intensivo deste herbicida fez com que as comunidades de plantas daninhas dos agroecossistemas criassem mecanismos de resposta na flora específica ou seleção de certos biótipos resistentes nas populações de plantas daninhas (LOPEZ-OVEJERO et al., 2006). O herbicida glyphosate foi amplamente adotado agricultura devido a sua capacidade de translocação dentro das plantas atingindo meristemas, raízes e órgãos de propagação vegetativa, inibindo a ação da EPSPs, enzima essencial na biossíntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, triptofano e diversos outros compostos secundários (AMRHEIN et al., 1980). Os genes que expressam a EPSPs são mais ativos nos meristemas, seguidos por colmos, folhas maturas e cotilédones (WEAVER; HERMANN, 1997). Trabalho realizado por Feng et al. (2003) evidenciou que existe íntima relação entre a expressão da EPSPs no tecido vegetal e a suscetibilidade ao glyphosate.

Os mecanismos que conferem a resistência de plantas daninhas ao glyphosate podem ser divididos em duas classes: (a) relacionados ao sítio de ação (chamada de específica) e (b) não relacionados ao sítio de ação (chamada de não específica). No primeiro caso, o herbicida atinge o sítio de ação, mas não consegue inibir a enzima do biótipo resistente, como acontece com os biótipos resistentes ao glyphosate que

possuem mutação na posição 106 da EPSPs, onde pode haver uma substituição do aminoácido prolina por uma serina, threonina, alanina ou leucina, mudando a forma com que o glyphosate se “acopla” à EPSPs (PEREZ-JONES et al., 2007; YU, CAIRNS; POWLES, 2007; PRESTON et al., 2009; WAKELIN; PRESTON, 2006; KAUNDUN et al., 2008; FUNKE et al., 2009). Há também casos em que o herbicida é capaz de realizar sua função, ou seja, inibir a ação da EPSPs, mas os biótipos resistentes possuem a habilidade de produzir mais EPSPs do que o glyphosate é capaz de inibir, conhecida como superexpressão gênica (GAINES et al., 2010). Quanto à resistência não relacionada ao sítio de ação, existem diversos mecanismos que conferem ao biótipo resistente a habilidade de sobreviver após uma aplicação de glyphosate: baixa absorção, baixa translocação, compartimentalização do herbicida no vacúolo e metabolismo do herbicida (DÉLYE; WANG; DARMENCY 2002; YUAN; TRANEL; STEWART JR., 2006).

Por outro lado, esses mecanismos não estão relacionados apenas à resistência de biótipos ao glyphosate, também podendo ser extrapolados para outros herbicidas. Biótipos de *Lolium rigidum* foram diagnosticados como resistentes a herbicidas inibidores do fotossistema II, inibidores da ACCase e inibidores da ALS através da metabolização das moléculas de herbicida, do qual representa um mecanismo de resistência não relacionado ao sítio de ação (PRESTON et al., 1996). Também por elevado metabolismo, biótipos de *Alopercurus myosuroides* são resistentes a chlorotoluron e isoproturon devido à atividade do complexo enzimático P450 (MOSS; CUSSANS, 1985). Da mesma maneira, biótipos *Echinochloa phyllopogon* foram constatados como resistentes ao fenoxaprop-p-mehtyl devido ao seu metabolismo pela glutathiona S-transferase (BAKKALI et al., 2007).

Entretanto, um dos casos mais curiosos é a resistência de diversos biótipos ao herbicida paraquat (PRESTON et al., 2005; SOAR et al., 2003; VÁRADI; DARKÓ; LEHOCZKI, 2000; YU; CAIRNS; POWLES, 2004), pois sabe-se que a sobrevivência de certos biótipos após a aplicação do paraquat é devido à baixa translocação do herbicida na planta, mas não se sabe qual é o mecanismo que confere essa resistência, nem para onde vai o herbicida, mas acredita-se que o paraquat seja capturado pela parede celular ou levado por transporte ativo através de algum carregador para o vacúolo (LASAT et al., 1997). Sabe-se também que a translocação diferenciada do paraquat nos biótipos resistentes é dependente da

temperatura, onde o mecanismo de resistência funciona apenas em temperaturas moderadas (LASAT et al., 1996).

Quanto aos mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação, dá-se destaque aos herbicidas inibidores da ALS, ACCase e fotossistema II. Os herbicidas do grupo triazinas, por exemplo, vem sendo usados desde meados dos anos 50, e até hoje foram identificadas 72 espécies que possuem biótipos resistentes a estes herbicidas (HEAP, 2015). Diversos desses biótipos resistentes às triazinas possuem uma substituição de uma serina por uma glicina na posição 264 do gene que codifica a proteína D1, importante molécula do fotossistema II (ARNTZEN; PFISTER; STEINBACK, 1982). Da mesma forma, a principal forma de resistência aos herbicidas inibidores da ALS é a mutação no gene que codifica essa enzima, onde já são conhecidas mais de 22 mutações em sete posições diferentes neste gene (TRANEL; WRIGHT, 2002). Já no caso da resistência aos inibidores da ACCase, a principal forma de resistência é por mutação no gene que codifica a carboxil transferase (ZAGNITKO et al., 2001; DÉLYE; WANG; DARMENCY, 2002).

O trabalho desenvolvido por Carvalho et al. (2012) estudou os mecanismos de resistência do capim-amargoso ao glyphosate e concluiu que há um “pool” de mecanismos que conferem a resistência ao herbicida de forma simultânea, não tendo especificamente um mecanismo isolado como sendo o principal. No entanto, o trabalho aqui apresentado trabalhou com diferentes populações das investigadas nesta pesquisa; sendo que a hipótese desta pesquisa é de que há predominância de um mecanismo que confere resistência, evidenciada pelo fato que mesmo populações em fase inciais de crescimento apresentam resistência elevada, fato que normalmente não acontece quando a translocação é o mecanismo de resistência. Também há evidências de que testes com chiquimato não demonstram insensibilidade da enzima ao glyphosate oque inviabilizaria a hipótese de alteração no sítio de ação.

Sendo assim, foi desenvolvida a presente pesquisa com o objetivo de estudar três possíveis mecanismos de resistência do capim-amargoso ao herbicida glyphosate: absorção e translocação diferencial e alteração do sítio de ação do herbicida, utilizando um biótipo de capim-amargoso comprovadamente resistente ao glyphosate oriunda do município de Matão - SP.

4.2 Material e Métodos

Os experimentos, nesta etapa do trabalho foram realizados parte no Centro de Energia Nuclear na Agricultura(CENA), localizado na Universidade de São Paulo em Piracicaba, SP, Brasil, quanto no Weed Molecular Laboratory localizado na Colorado State University, Fort Collins, CO, Estados Unidos da América do Norte. Para que a pesquisa fosse possível de ser realizada, as sementes dos biótipos foram exportadas do Brasil aos Estados Unidos da América através do departamento de agricultura daquele país (USDA) e por meio de sua agência especializada na fiscalização de plantas e animais que regula a entrada e saída de material biológico (APHIS – Animal and Plant Health Inspection Service).

4.2.1 Absorção e translocação do herbicida glyphosate nos biótipos resistentes e suscetível de *Digitaria insularis.*

O experimento foi conduzido durante os meses de agosto a novembro de 2014. Os biótipos do capim-amargoso foram semeados em bandejas em substrato comercial e imediatamente colocados na estufa do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, com temperatura média de 28ºC. Quando os *seedlings* se estabeleceram foram transplantados para vasos individuais e mantidos em câmara de crescimento até atingirem o estádio 23 na escala da BBCH (HESS et al., 1997), momento em que o tratamento com glyphosate marcado (^{14}C-glyphosate) foi aplicado. Os biótipos resistentes, que sobriveveram a aplicação da dose de glyphosate de 1440 g.e.a ha^{-1}, foram oriundos dos municípios de Diamantino – MT (MT), Campo Florido – MG (MG) e Matão – SP (R), cujas coordenadas geográficas são respectivamente S 14° 25' 53.57'' O 56° 13' 41. 31'', S 19°45'48.80'' O 48°34'19.47'' e S 21° 36' 44.4'' O 48°27' 24.4''. Já o biótipo suscetível provém de uma área sem histórico de aplicação de glyphosate do município de Iracemápolis – SP (S) cujas coordenadas geográficas são S 22° 39' 17.1'' O 47° 29' 32.39''.

Primeiramente, foi aplicado o tratamento de glyphosate na dose de 960 gramas de equivalente ácido por hectare (g.e.a.ha^{-1}) utilizando um pulverizador costal pressurizado por CO_2 e calibrado para um volume de calda proporcional a 200 L.ha^{-1}. Em seguida as plantas foram levadas ao laboratório do CENA, onde as mesmas

receberam uma aplicação de glyphosate marcado, para que cada planta recebesse o total de 40.000 desintegrações por minuto (DPM). Os tratamentos foram realizados na folha mais nova que estava totalmente expandida em cinco repetições de cada biótipo, sendo que uma repetição foi destinada a autorradiografias e as outras quatro seriam analisadas estatisticamente. A aplicação foi realizada com a ajuda de uma pipeta de precisão (GILSON PIPETMAN®), da qual foram aplicadas dez gotas de 0,5 uL cada. As plantas foram deixadas por aproximadamente uma hora para que todos os tratamentos aplicados secassem/tornassem estáveis para o transporte das plantas novamente para a casa-de-vegetação, onde permaneceram até o momento da coleta das amostras.

Após os intervalos de tempo das avalições de 6, 12, 24, 48, e 96 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT), cada planta teve sua folha aplicada amostrada com uma tesoura, rente à lígula e imediatamente lavada em 10 ml, dentro de frascos por agitação com a utilização de um *vortex*, de uma solução contendo 10% metanol, 89,75% água deionizada e 0,25% surfactante não-iônico (NIS), para que o ingrediente ativo remanescente na superfície foliar fosse retirado e calculado posteriormente. Os 10 ml em que as folhas foram lavadas tiveram adição de outros 10 ml de um coquetel de cintilação líquida (CCL) para a leitura da radiação beta emitida pelos átomos marcados na molécula do glyphosate, chamado Ultima Gold™, do qual dispensa a correção da fluorescência de Quench (GIBSON, 1980). Também foram feitas amostras designadas *blank*, ou seja, sem a adição de qualquer outro produto além do coquetel, e foi também realizada a adição de ^{14}C-glyphosate diretamente no coquetel para que a quantidade de glyphosate aplicado em cada planta fosse mensurada com maior precisão. As partes das plantas foram separadas em folha tratada, caule central, perfilhos e raiz sendo levadas para estufa de secagem por circulação forçada a 60 ℃ por 72 ho ras. Após a secagem o material foi incinerado em um oxidador, fazendo com que o ^{14}C presente nas amostras fosse transformado em $^{14}CO_2$ e aprisionado em um frasco contendo 5 ml de CCL. As plantas que não foram utilizadas para a oxidação e quantificação de ^{14}C-glyphosate em suas partes foram submetidas à autorradiografia. Um indivíduo de cada biótipo por coleta foi prensado por uma semana como se fosse uma exsicata, e em seguida foram transferidas para um *cassette* (GE Health Care, EUA) e alí permaneceram por 48 horas para que as partículas betas emitidas pelo glyphosate marcado fossem captadas. Após esse período, os cassettes foram lidos em um *Phosphorus Imaging*

(Molecular Dynamics, Storm 860, EUA). Por fim, os frascos foram colocados em um analisador de cintilação líquida e os resultados obtidos foram submetidos ao modelo proposto por Kniss et al. (2011) utilizando a seguinte fórmula (equação 4.1) para a obtenção da quantidade de glyphosate absorvido, onde A_{max} representa a absorção máxima ou quantidade percentual de glyphosate marcado; ϴ é um percentual determinado de A_{max}; t o tempo e tϴ o tempo necessário para atingir o percentual determinado:

$$Absorção = Amax\ x < 1 - \exp\{\log[(100 - \Theta)/100]x\ (t/t\Theta)]\ \} \qquad (4.1)$$

Com a obtenção dos dados, estes tiveram o teste de homogeneidade da variância analisado, bem como a análise dos seus resíduos e em seguida foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey, em um esquema fatorial, com 2 fatores, onde o fator biótipo teve quatro níveis (biótipo S, R, MG e MT) e o fator tempo teve seis níveis (0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após o tratamento), a 5% de probabilidade. As análises de absorção e translocação pelo tempo comparando entre os biótipos foram realizadas com o software R.

4.2.2 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Digitaria insularis*

Os biótipos utilizados para este experimento foram os de Iracemápolis – SP (S) e Matão – SP (R). As amostras dos biótipos S e R foram coletadas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, da qual foi escolhido o tecido vegetal mais jovem, na quantidade de quatro repetições por biótipo. Este tecido vegetal foi estocado em um tubo eppendorf® com volume de 1,5 ml e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido (por volta de -210 ºC) até o fim da coleta, dos quais em seguida foram armazenados em um freezer à temperatura de -80ºC para posterior extração do material genético. Mergulhou-se o tecido vegetal imediatamente após sua coleta, com o intuito de evitar que os componentes moleculares degradem (JONES et al., 2012).

As amostras congeladas foram maceradas com a ajuda de um almofariz e nitrogênio líquido, sempre mantendo as amostras resfriadas, evitando a ação das

nucleases e destruição do material genético. Ao final da maceração, foi utilizado o kit RNeasy® Plant Mini Kit, para a extração do RNA mensageiro das amostras (mRNA), conforme orientação do fabricante. Anteriormente à adoção do procedimento de extração de RNA, foram feitas várias tentativas de análise do gene que codifica a EPSPs através de DNA genômico. Todavia, segundo Alberts et al., (2007) quando o procedimento é adotado em plantas que não possuem seu código genético totalmente conhecido na literatura, existe a possibilidade de entre partes do gene que realmente codificam a proteína, exons, estarem presentes em partes que não codificam a proteína, introns, o que gera a necessidade da sintetização do DNA complementar . Após a extração do mRNA, foi utilizado o espectrofotômetro (NanoDrop® 2000c) para a quantificação da concentração do ácido nucleico e sua pureza.

Após a extração do RNA com a ajuda do kit acima citado, foi necessária a utilização de outro kit, o DNase I, Amplification Grade®, para a digestão de DNA com uma e duas fitas para formas menores, eliminando o DNA presente nas amostras, fazendo com que contenham apenas RNAm, segundo especificações do fabricante.

Obtendo-se nas amostras apenas RNA de fita simples, utilizou-se o último kit qScript™ cDNA SuperMix para a obtenção de DNA complementar (cDNA), que é o código genético que irá codificar a proteína desejada sem a presença dos introns, conforme orientação do fabricante. Esse kit contém os componentes necessários para a transformação de mRNA a cDNA por conter em sua composição reagentes como solução tampão, cloreto de magnésio, primers, nucleotídeos e a proteína transcriptase reversa.

Com o cDNA sintetizado, procedeu-se com a confecção de primers específicos para amplificar apenas a sequência de ácidos nucleicos referentes ao gene que codifica a EPSPs. Para isso, foram utilizadas referências bibliográficas (KAUNDUN et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; GAINES et al., 2010; PEREZ-JONES et al., 2007) e as bibliotecas online (NCBI – National Center for Biotechnology Information) para obter-se a sequência de nucleotídeos e aminoácidos que codificam a EPSPs em espécies proximidade evolutiva ao capim-amargoso, como o *Lolium multiflorum* e a *Digitaria sanguinallis*. Através de diversas tentativas e erros, o primer que melhor amplificou a sequência desejada foi o seguinte: 5’- AGCTGTAGTCGTTGGCTGTG-3’ representando o primer “forward” e 5’- GCCAACAAATAGCTCGCACT -‘3

representando o primer “reverse”. Em seguida, foi realizado o PCR tradicional (MyCycler™, Bio-Rad, EUA), em que foram utilizados os seguintes reagentes: 25uL de EconoTaq® PLUS Green Master Mix, 2uL dos primers forward e reverse (20mM), 1uL de cDNA (50ng uL-1) e o restante com água pura até completar 50 uL por reação. O ciclo que obteve melhor desempenho dos primers foi o seguinte: 5 minutos a 95ºC, 1 minuto a 95ºC, 30 segundos a 60ºC, 1 minuto a 72ºC e 3 minutos a 72ºC. Os produtos foram submetidos à eletroforese, com solução tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0) e gel de agarose a 1,5% para a separação do cDNA segundo seu tamanho em relação a fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (GeneRuler™1kb DNA Ladder). As bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose foram recortadas e purificadas através do kit QIAquick®Gel Extraction, seguindo orientações do fabricante, e em seguida enviadas para sequenciamento em departamento da Colorado State University (PMF – Proteomics and Metabolomics Facility). Os resultados do sequenciamento foram analisados com a ajuda do software CHROMAS®, e compararam-se os biótipos suscetível e resistente, a partir das quais foram tiradas conclusões sobre mutações nesse gene. Foi utilizado o software online ClustalW2 (LARKIN et al., 2007) para alinhamento das sequências obtidas com as sequências encontradas na literatura.

A partir das consultas na literatura a respeito da sequência de nucleotídeos e aminoácidos que compõe a EPSPs, foi estimado o tamanho das bandas que os primers desenhados deveriam possuir quando realizada a eletroforese do produto do PCR tradicional. Além da técnica de eletroforese, as amostras também foram submetidas ao equipamento Fragment Analyzer™ - Advanced Analytical – do qual, pelo mesmo princípio da eletroforese, mostra por meio de seu software o tamanho exato dos fragmentos de DNA amplificados pelo PCR. Em cada etapa foram usados primers de referência, sendo eles referentes aos genes que codificam a enzima CCR, ALS e IDH, bem como primers e cDNA de *Amaranthus palmeri* utilizados por Gaines et al. (2010).

As bandas obtidas através de eletroforese em gel de agarose foram recortadas e purificadas através do kit QIAquick®Gel Extraction, seguindo as instruções do fabricante e enviadas para sequenciamento em departamento especializado da Colorado State University (PMF – Proteomics and Metabolomics Facility). Os resultados do sequenciamento foram analisados com a ajuda do software

CHROMAS®, comparando os biótipos suscetível e resistente, gerando as conclusões sobre as mutações nesse gene. Foi utilizado o software online ClustalW2 (LARKIN et al., 2007) para alinhar as sequências obtidas com as encontradas na literatura.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Absorção e translocação do herbicida glyphosate nos biótipos resistente e suscetível de *Digitaria insularis*

As médias percentuais referentes às quantidades de ^{14}C-glyphosate absorvidas e translocadas, nos diferentes períodos de avaliação estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 -^{14}C-glyphosate absorvido e translocado nos diferentes períodos de avaliação, referentes aos biótipos S, R, MG e MT. Piracicaba, 2015

Biótipo	Horas após o tratamento (HAT)	Radioatividade (%)[1]		
		Absorção	Retenção folliar	Translocação*
S	6	42,7	88,5	11,5
	12	37,8	92,9	7,1
	24	32,6	81,5	18,5
	48	63,4	78,1	21,9
	96	80,6	63,0	37,0
R	6	58,0	93,4	6,6
	12	36,2	90,5	9,5
	24	37,4	86,9	13,1
	48	72,7	78,8	21,2
	96	89,5	52,6	47,4
MG	6	33,9	93,7	6,3
	12	33,2	85,9	14,1
	24	27,7	77,9	22,1
	48	79,7	72,0	28,0
	96	89,1	40,6	59,4
MT	6	44,7	88,2	11,8
	12	21,8	91,0	9,0
	24	28,0	88,5	11,5
	48	60,4	77,4	22,6
	96	87,1	57,0	43,0

[1]Média percentual dos dados obtidos de radioatividade; *Translocação equivale a soma das quantidades percentuais de ^{14}C-glyphosate translocadas para raízes e colmos.

De acordo com os resultados, podemos notar um aumento da absorção de ^{14}C-glyphosate nas avalições de 48 e 96 HAT, o que também acontece para a translocação para raízes e colmos.

Analisando-se o fator biótipo para a quantidade máxima de absorção de glyphosate e tempo necessário para absorção de 90% do valor máximo (t90), não foi possível observar diferenças estatísticas entre os biótipos R, MG e MT quando comparados com o biótipo S utilizando o modelo proposto por Kniss et.al.(2011), como mostrado nas Tabelas 4.4 e 4.5 .

Tabela 4.2 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem ao nível de 5%, a absorção foliar máxima de ^{14}C-glyphosate. Piracicaba, 2015

Biótipo	Amax*	Erro padrão	Valor-p de significância
S	74,6	11,2	<0,01
R	82,1	11,1	<0,01
MG	96,7	14,6	<0,01
MT	96,2	21,5	<0,01

*Absorção foliar máxima de ^{14}C-glyphosate.

Tabela 4.3 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem ao nível de 5%, o tempo necessário para obter 90% da absorção foliar máxima de ^{14}C-glyphosate. Piracicaba, 2015

Biótipo	t90*	Erro padrão	Valor-p de significância
S	48,7	22,2	0,0309
R	44,5	19,3	0,0238
MG	82,3	27,8	0,0040
MT	104,8	47,9	0,0314

* tempo necessário para obter 90% da absorção foliar máxima de ^{14}C-glyphosate.

Tabela 4.4 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem o teste comparativo de significância ao nível de 5%, para absorção foliar máxima de ^{14}C-glyphosate (Amax). Piracicaba, 2015

Biótipos comparados	Valor estimado (Amax)	Erro padrão	Valor-p de significância
S - R	-7,4	15,7	0,6384
S - MG	-22,1	18,4	0,2331
S - MT	-21,5	24,2	0,3764
R - MG	-14,6	18,3	0,4258
R - MT	-14,1	24,2	0,5606
MG - MT	0,5	25,9	0,9838

Tabela 4.5 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem o teste comparativo de significância ao nível de 5%, p tempo necessário para absorção de 90% do valor máximo (t90) de ^{14}C-glyphosate. Piracicaba, 2015

Biótipos comparados	Valor estimado (t90)	Erro padrão	Valor-p de significância
S - R	4,2	15,7	0,8874
S - MG	-33,6	18,4	0,3477
S - MT	-56,1	24,2	0,2908
R - MG	-37,8	18,3	0,2680
R - MT	-60,3	24,2	0,2464
MG - MT	-22,5	25,9	0,6854

Experimentos que visam avaliar o movimento de um determinado herbicida na planta, utilzam técnicas destrutivas para cada avaliação em diferentes tempos após a aplicação, o que exige unidades experimentais independentes para cada avaliação. Kniss et al. (2011) preconizam que cada coleta em determinado período (horas após o tratamento) apresenta um valor pontual, porém importante para a caracterização do experimento como um todo. Ainda segundo os autores, é comum encontrar na literatura estudos que ignoram a estrutura do trabalho como um todo, pois utilizam de comparações estatísticas dentro de cada tratamento, como testes de comparações múltiplas. Cousens (1985) ressalta que o experimento sobre absorção de herbicidas deve ser analisado como um todo, visto que o objetivo do mesmo é avaliar destrutivamente as plantas criando regressões que representem o

comportamento dos dados durante todo o período em que o estudo foi conduzido, viabilizando a verificação de algum dado em determinado ponto de interesse, e não apenas nas datas da coleta.

O uso de funções do tipo regressão assimptótica para descrição da absorção de herbicidas nas plantas é de comum prática para melhor visualização do comportamento do herbicida aplicado ao longo do tempo (BUKUN et al., 2009; DODDS et al., 2007; GRANGEOT; CHAUVEL; GAUVRIT, 2006). Sendo assim, foi confeccionado um gráfico que ilustra a absorção de ^{14}C-glyphosate nos biótipos submetidos a este experimento. A Equação 4.1 descrita anteriormente foi adotada para confecção do mesmo que está representado na Figura 4.1.

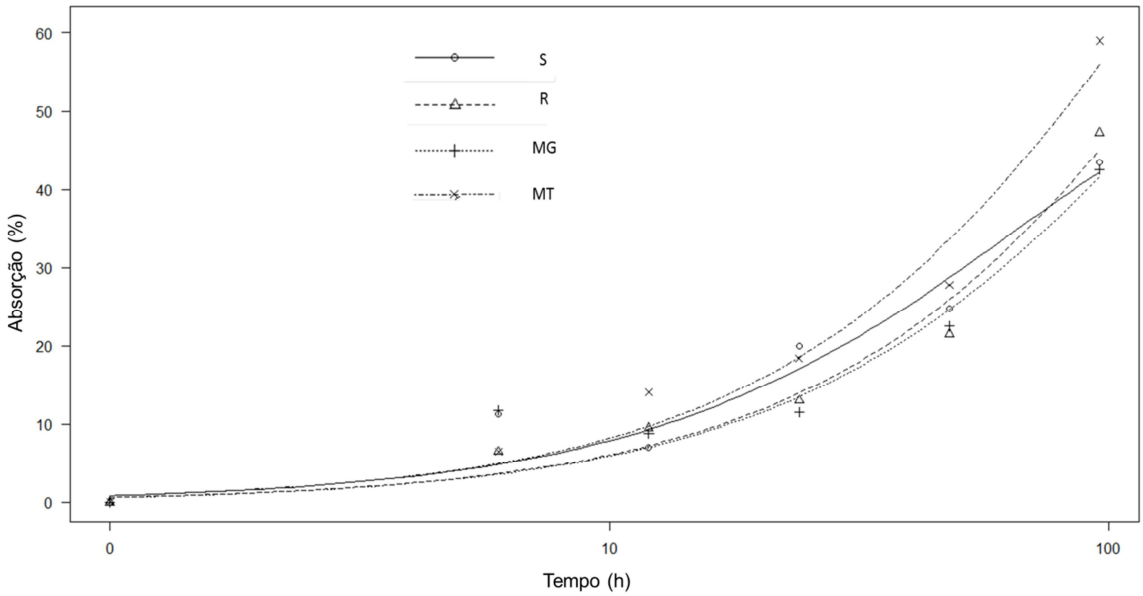

Figura 4.1 – Absorção de ^{14}C-glyphosate nos biótipos S, R, MG e MT em função do tempo. Piracicaba, 2015

O gráfico da Figura 4.1 representa a absorção do ^{14}C-glyphosate desde sua aplicação na superfície da folha dos biótipos estudados até às 96 horas após o tratamento. Considerando a Tabela 4.1, o biótipo S teve absorção máxima de 80,6% do total aplicado, enquanto que o biótipo R teve absorção máxima de 89,5%, o biótipo MG apresentou absorção máxima de 89,1% e o biótipo MT apresentou absorção máxima de 87,1%. Koger e Reddy (2005) estudaram tanto a absorção como a translocação de ^{14}C-glyphosate em *Conyza canadensis*, e concluíram que o

biótipo suscetível absorveu quantidades estatisticamente semelhantes do ingrediente ativo aplicado comparado com o biótipo resistente. Pérez et al. (2007) também encontraram similar absorção de ^{14}C-glyphosate por biótipos resistente e suscetível de *Lolium multiflorum*. Brunharo (2014) encontrou absorção máxima 17% inferior do biótipo resistente quando o comparado com o suscetível para a espécie *Chloris elata*.

Carvalho et al. (2012) observaram que o biótipo suscetível de *Digitaria insularis* absorveu pelo menos 12% a mais de ^{14}C-glyphosate que o biótipo resistente na avaliação efetuada 48 horas após o tratamento (HAT), no entanto os biótipos alcançaram absorções máximas semelhantes nas avaliações de 96 HAT, fato que corresponde com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Observando os valores dos t90 dos biótipos, é possível notar através da estimativa apresentada na Tabela 4.3 que os biótipos resistentes MG e MT precisaram de um tempo maior para absorver 90% do total de ^{14}C-glyphosate que os biótipos S e R. Todavia a comparação entre os biótipos mostra que não há diferença estatística entre os valores de t90, como está demonstrado na Tabela 4.5.

Tabela 4.6 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem ao nível de 5%, a translocação máxima de ^{14}C-glyphosate. Piracicaba, 2015

Biótipo	**Tmax***	**Erro padrão**	**Valor-p de significância**
S	54,2	10,8	<0,001
R	99,9	38,9	0,012
MG	78,7	35,4	0,029
MT	100	24,4	<0,001

*Translocação máxima de ^{14}C-glyphosate.

Tabela 4.7 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem ao nível de 5%, o tempo necessário para obter 90% da translocação total máxima de ^{14}C-glyphosate. Piracicaba, 2015

Biótipo	t90*	Erro padrão	Valor-p de significância
S	146,7	51,3	0,005
R	368,8	182,2	0,046
MG	294,2	179,4	0,105
MT	270,1	91,6	0,004

* tempo necessário para obter 90% da translocação máxima de ^{14}C-glyphosate.

Tabela 4.8 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem o teste comparativo de significância ao nível de 5%, para translocação máxima de ^{14}C-glyphosate (Tmax). Piracicaba, 2015

Biótipos comparados	Valor estimado (Tmax)	Erro padrão	Valor-p de significância
S - R	-4,50E+01	4,04E+01	0,2609
S - MG	-2,44E+01	3,70E+01	0,5108
S - MT	-4,57E+02	2,67E+01	0,0903
R - MG	-2,12E+01	5,26E+01	0,6870
R - MT	-2,81E-02	4,59E+01	0,9995
MG - MT	-2,13E+01	4,29E+01	0,6216

Tabela 4.9 - Parâmetros estimados pelo software R, utilizando o modelo proposto por Kniss, et.al.(2011), referentes aos biótipos S, R, MG e MT, que descrevem o teste comparativo de significância ao nível de 5%, p tempo necessário para translocação de 90% do valor máximo (t90) de ^{14}C-glyphosate. Piracicaba, 2015

Biótipos comparados	Valor estimado (t90)	Erro padrão	Valor-p de significância
S - R	-222,8	189,3	0,2437
S - MG	-147,5	186,6	0,4316
S - MT	-123,4	105,1	0,2433
R - MG	74,7	255,7	0,7709
R - MT	98,8	203,9	0,6294
MG - MT	24,1	201,5	0,9052

Adu-Yeboah et al. (2014) analisando biótipos resistentes e suscetíveis de *Lolium rigidum*, descobriram que 48 horas após a aplicação dos tratamentos, os biótipos resistentes retinham duas vezes mais ^{14}C-glyphosate nas folhas tratadas em relação aos biótipos suscetíveis, translocando menos herbicida para o resto da planta, concluindo que este era o mecanismo de resistência. Outro experimento com biótipos resistentes de *Sorghum halepense*, mostrou maior retenção foliar de glyphosate no biótipo resistente, com diferença porcentual de 28% ao comparar com o biótipo suscetível (RIAR et al.; 2011). Os dados encontrados 96 HAT presentes na Tabela 4.1, mostram que o biótipo suscetível S translocou 37% do ^{14}C-glyphosate, enquanto que os biótipos resistentes R, MG e MT translocaram 47,4%, 57,4% e 43% respectivamente. Ao submetermos os dados ao modelo proposto por Kniss, et.al. (2011), o teste de comparações entre biótipos não mostrou diferenças estatísticas entre os mesmos, o que pode ser visualizado na Tabela 4.8 indicando que este não é o mecanismo de resistência relacionado às populações avaliadas nesta pesquisa. Não houve diferença estatística entre os tempos necessários para que as populações alcançassem 90% da absorção máxima, como mostra a Tabela 4.9.

Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Carvalho, et.al. (2012), que encontrou 70% do herbicida aplicado na folha tratada e 17,78% nas raízes do biótipo resistente enquanto o biótipo suscetível apresentou 42,94% na folha tratada e 32,23% nas raízes. Brunharo (2014) estudando a translocação de ^{14}C-glyphosate em biótipos resistente e suscetível de *Chloris elata*, notou uma maior retenção do herbicida na folha tratada do biótipo resistente e consequente menor translocação.

A Figura 4.2 mostra a quantidade de ^{14}C-glyphosate translocado na planta das folhas tratadas para os colmos e raízes nos biótipos estudados, durante todos os períodos de avaliação após o tratamento. Todas as curvas mostram uma ascensão ao longo do tempo, o que indica o aumento da translocação conforme as horas após o tratamento aumentam. Já a Figura 4.3 mostra a presença de ^{14}C-glyphosate na planta em cada período de avaliação dos biótipos S, R, MG e MT. Nas autorradiografias também é possível notar que o herbicida translocou para todas as partes da planta no último período de avaliação, indicando que não há diferença entre os biótipos.

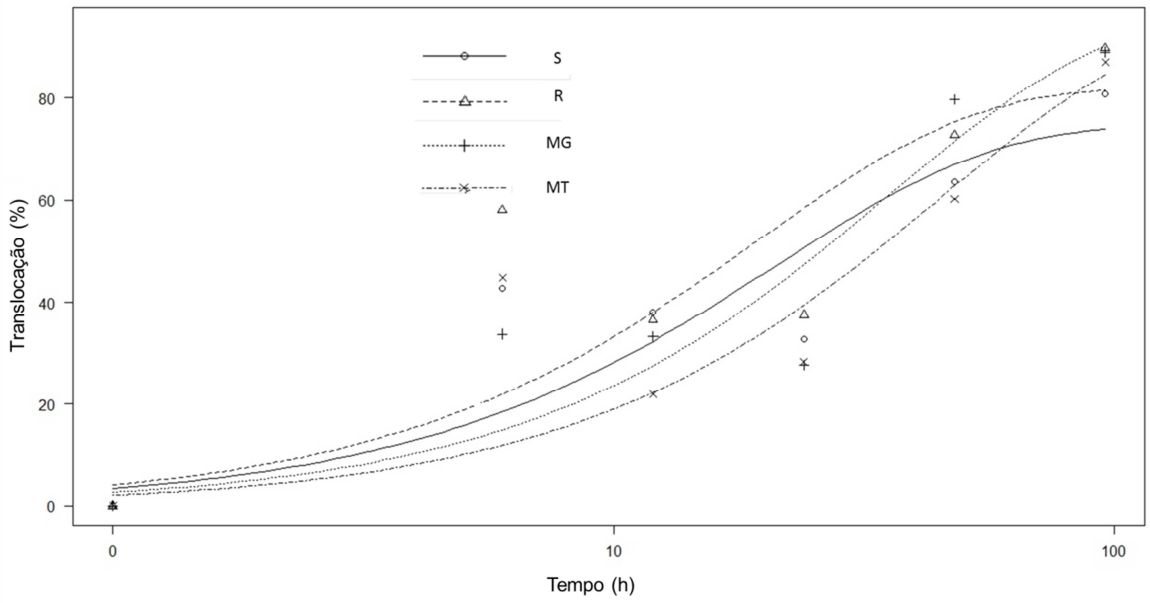

Figura 4.2 – Translocação de ^{14}C-glyphosate nos biótipos S, R, MG e MT em função do tempo. Piracicaba, 2015

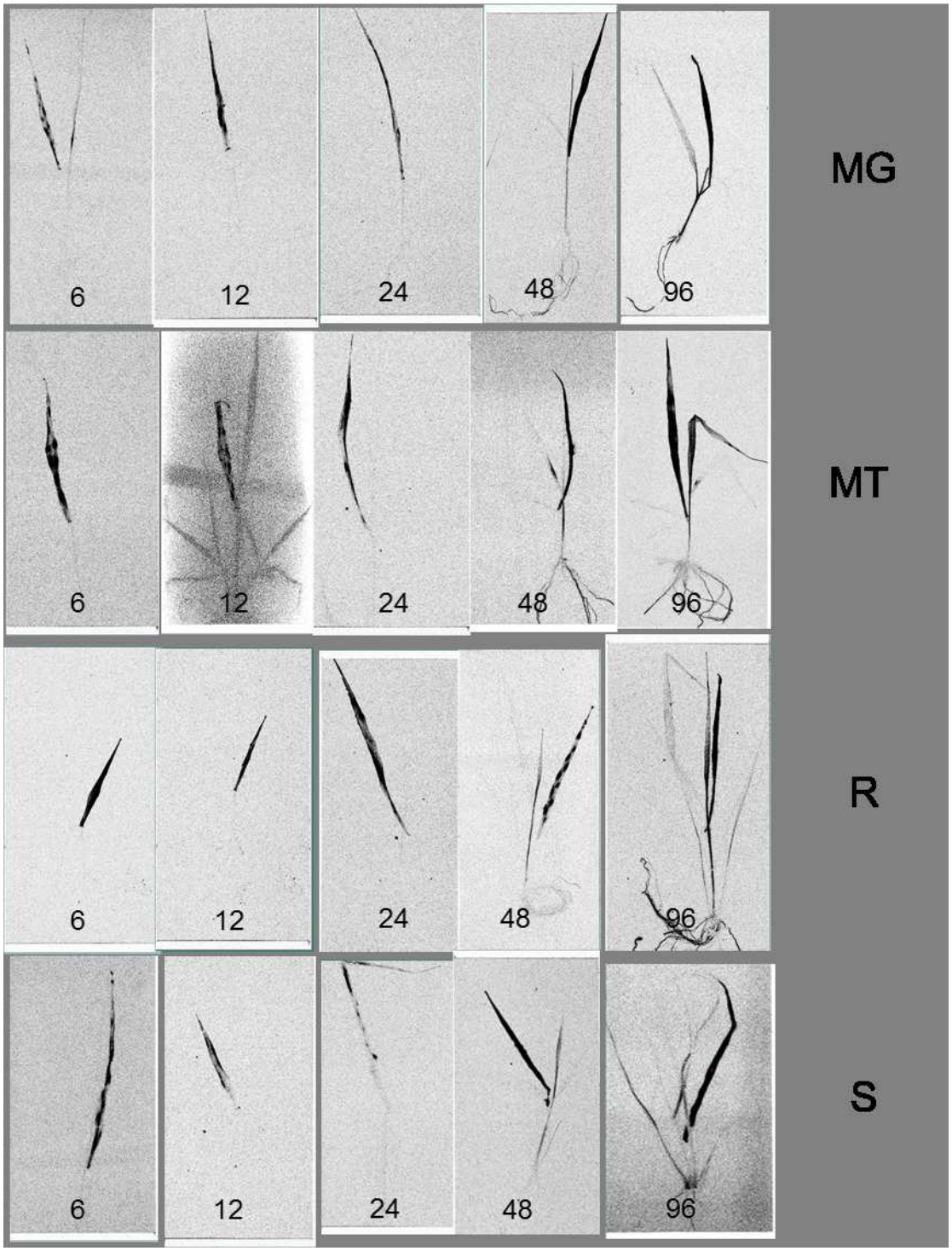

Figura 4.3 – Autorradiografia do ^{14}C-glyphosate presente nos biótipos S, R, MG e MT 6, 12, 24, 48 e 96 horas após o tratamento. Piracicaba, 2015

4.3.2 Mutação no gene que codifica a EPSPs em biótipos resistente e suscetível de *Digitaria insularis*

Foi realizado um PCR contendo o cDNA de cinco repetições dos biótipos S e R, que posteriormente foram mandadas para sequenciamento. Conforme esperado, baseando-se nos primers desenhados, o fragmento do gene que codifica a EPSPs deveria ter por volta de 200 pares de bases. A sigla “DIGIN_S” representa o biótipo suscetível e “DIGIN_R” representa o biótipo resistente, além de um sequenciamento encontrado na literatura que é representado pela planta daninha *Lolium multiflorum* (LOLMU) (PEREZ-JONES et al., 2007). A marcação em formato quadrado na posição superior da Figura destaca a posição 106, comumente documentada como a posição em que ocorre substituição do aminoácido prolina por outro aminoácido e que confere resistência de plantas daninhas ao glyphosate (PEREZ-JONES et al., 2007; WAKELIN; PRESTON, 2006; KAUNDUN et al., 2008).

O quadrado na parte inferior da imagem ilustra a posição 182, da qual foi documentada uma mutação que esta está relacionada com a resistência de *Digitaria insularis* ao glyphosate em biótipos do estado de São Paulo (CARVALHO et al., 2012).

```
DIGIN_S         GTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAACGGCAATGCGGCCATTGACAGCAGCCGTAACT 60
DIGIN_R         GTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAACGGCAATGCGGCCATTGACAGCAGCCGTAACT 60
LOLMU           GTCAAGCTCTTCTTGGGCAACGCTGGAACTGCAATGCGGCCATTGACGGCTGCTGTAGTA 60
                **..*************.**.********.***************.**.**.***...

DIGIN_S         GCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCC 120
DIGIN_R         GCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCC 120
LOLMU           GCTGCTGGTGGAAATGCGACTTATGTTCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGCGACCT 120
                ********.********.********.***********.*********.*****.****.

DIGIN_S         ATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTCGGTGCGGATGTTGATTGCTTCCTTGGC 180
DIGIN_R         ATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTCGGTGCGGATGTTGATTGCTTCCTTGGC 180
LOLMU           ACCGGTGACTTAGTTGTCGGTTTGAAACAGCTAGGTGCGAATGTTGATTGTTTCCTTGGC 180
                *..**.*****.********.***********.******.**********.*********

DIGIN_S         ACTGACTGCCCACCTGTTCGTGTCAAGGGAATTGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAG 240
DIGIN_R         ACTGACTGCCCACCTGTTCGTGTCAAGGGAATTGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAG 240
LOLMU           ACTGACTGCCCACCTGTTCGGATCAACGGCATTGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAG 240
                ********************..**** **.******************************

DIGIN_S         CTATCTGGCTCTATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGC 280
DIGIN_R         CTATCTGGCTCTATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGC 280
LOLMU           CTGTCTGGTTCCATCAGCAGCCAATACTTGAGTTCCTTGC 280
                **.*****.**.********.**.*********.******
```

Figura 4.3 – Sequência de nucleotídeos dos biótipos S e R que codifica a EPSPs e as posições 106 e 182 destacadas. Fort Collins, 2015

Através da Figura 4.3, que mostra o alinhamento de um seguimento do gene que codifica a EPSPs, é possível perceber que não existe mutação na posição 106 a qual está ocupada por um aminoácido prolina, nem em outras posições dessa sequência, como exemplo a posição 102, que também pode propiciar menor suscetibilidade do indivíduo ao glyphosate. As diferenças existentes estão representadas pela ausência de um asterisco na parte inferior da sequência, mostram as mutações que ocorrem entre a espécie azevém (*Lolium multiflorum*) e os biótipos de *D. insularis*, porém não é possível visualizar diferenças entre as sequências dentro dos biótipos S e R.

Na literatura existem dois tipos de EPSPs documentadas, ambas representadas conforme sua sensibilidade ao glyphosate: a classe I é encontrada em todas as espécies de plantas e em bactérias como a *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, tendo sua atividade inibida por baixas concentrações de glyphosate (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). A EPSPs classe II, encontrada em algumas espécies de bactérias, até mesmo em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniai* e *Agrobacterium* sp. Strain CP4, são dotadas da habilidade de manter sua atividade catalítica mesmo na presença de altas concentrações deste herbicida (DILL; JACOB; PADGETTE, 2008; FUNKE et al., 2005; PRIESTMAN et al., 2005).

A insensibilidade ao glyphosate por algumas plantas com a enzima classe I pode ser alcançada artificialmente ou através de seleção natural. Partindo-se de que o glyphosate e o fosfoenolpiruvato (PEP) se ligam no mesmo local na EPSPs, é esperado que os mutantes que possuem a mutação nessa posição tenham tanto menor afinidade PEP quanto pelo glyphosate (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Algumas mutações pontuais como a substituição de uma treonina por uma metionina na posição 47 (HE; NIE; XU, 2003), substituição de uma glicina por uma alanina na posição 101 (PADGETTE et al., 1991) e prolina por uma serina na posição 106 (STALKER; HIATT; COMAI, 1985) podem resultar em menor afinidade ao glyphosate, mas não suficiente para suportar altas dosagens deste herbicida. Por outro lado, a mutação de uma treonina por uma isoleucina na posição 102, juntamente com a mutação de uma prolina por uma serina na posição 106, também conhecida como mutação “TRIS”, pode habilitar os indivíduos a receber altas quantidades de glyphosate, conhecimento este que propiciou a sua utilização artificialmente em culturas geneticamente modificadas. Outra combinação de

mutações conhecida com “TIPS”, que consiste da mutação na posição 102 juntamente com a mutação na posição 106 (T102I+P106S), foi encontrada em biótipos de *Eleusine indica*, que apresentaram um fator de resistência da ordem de 180 vezes quando comparados ao biótipo suscetível e de 32 vezes quando comparados com o biótipo resistente que possuía apenas a mutação da prolina na posição 106 (Yu, et.al., 2015).

4.4 Conclusões

Os biótipos R, MG e MT não apresentaram diferenças de absorção e translocação de ^{14}C-glyphosate quando comparados com o biótipo S.

O sequenciamento do gene que codifica a EPSPs mostrou não haver mutação na região 106 nem na região 182, ou outro tipo de mutação na sequência analisada desse gene. Podemos concluir que estes não são os mecanismos que conferem resistência dessa planta daninha ao glyphosate.

Referências

ADU-YEBOAH, P.; MALONE, J. M.; GILL, G.; PRESTON, C. Reduced translocation in two glyphosate-resistant populations of Rigid Ryegrass (Lolium rigidum) from fence lines in south Australia. **Weed Science**, Lawrence, v. 62, p. 4-10, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Graland Science, p. 1392, 2007.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate, II: interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 66, p. 830–834, 1980.

ARNTZEN, C.J.; PFISTER, K.; STEINBACK, K.E. The mechanism of chloroplast triazine resistance: alterations in the site of herbicide action. In: LEBARON, H.M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Herbicide resistance in plants**. New York: Wiley, p. 185 - 214, 1982.

BAKKALI, Y.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; OSUNA, M.D.; WAGNER, J.; FISHER, A.J.; DO PRADO, R.D. Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. **Journal of Agricultural and Food and Chemistry**, Davis, v. 55, p. 4052–4058, 2007.

BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C.; GAZZIERO, D.L.P.; ADEGAS, F.S.; VOLL, E. Cadastramento fitossociológico de plantas daninhas na cultura de girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 651-657, 2003.

BRUNHARO, C.A.C.G. **Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris Polydactyla*) ao herbicida glyphosate.** p. 1-153 Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

BUKUN, B.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; WESTRA, P.; BRUNK, G.; SHANER, D.L.; SLEUGH, B.B.; PETERSON, V.F. Aminopyralid and clopyralid absorption and translocation in Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 10-15, 2009.

CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; ROJANO-DELGADO, A.M.; DE PRADO, R. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, p. 615-622, 2012.

COUSENS, R. Misinterpretations of results in weed research through inappropriate use of statistics. **Weed Research**, Oxford, v. 28, p. 281-289, 1985.

DÉLYE, C.; WANG, T.Y.; DARMENCY, H. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. **Planta,** Berkeley, v. 214, p. 421–427, 2002.

DILL, G.M.; JACOB, C.A.; PADGETTE, S.R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, Malden, v. 54, p. 326-331, 2008.

DODDS, D.M.; REYNOLDS, D.B.; MASSEY, J.H.; SMITH, M.C.; KOGER, C. H. Effect of adjuvants and urea ammonium nitrate on bispyribac efficacy, absorption, and translocation in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*), II: absorption and translocation. **Weed Science,** Lawrence, v. 55, p. 406-411, 2007.

FENG, P.C.C.; CHIU, T.; SAMMONS, R.D. Glyphosate efficacy is contributed by its tissue concentration and sensitivity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 77, p. 83–91, 2003.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **Glyphosate:** a unique global herbicide. Washington: American Chemical Society, 1997. v. 1, 653 p.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEARLY-FRIED, M.L.; FISHER, M.; SCHONBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p. 13010-13015, 2005.

FUNKE, T.; YANG, Y.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M.; OLESEN, S.; BECKER, A. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 ->Ile and Pro 101 -> Ser in 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Syntase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Fort Collins, v. 284, n. 15, p. 9854-9860, 2009.

GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, p. 1029–1034, 2010.

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

GIBSON, J.A.B. Modern techniques for measuring the quench correction in a liquid scintillation counter. In: PENG, C.T.; HORROCKS, D.L.; ALPEN, E.L. (Ed.). **Liquid scintillation counting:** recent applications and developments. New York: Academic Press, 1980. p. 153-172.

GRANGEOT, M.B.; CHAUVEL, B.; GAUVRIT, C. Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 152-162, 2006.

HE, M.; NIE, Y.F.; XU, P. A T42M substitution in bacterial 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) generates enzymes with increased resistance to glyphosate. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, p. 1405-1409, 2003.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 26 nov. 2015.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale – general for descriptions pf the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, p. 433-441, 1997.

JONES, R.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; WAALAND, S. **The molecular life of plants**. Portland: Wiley, 2012. 742 p.

KAUNDUN, S.V.; ZELAYA, I.A.; DALE, R.P.; LYCETT, A.J.; CARTER, P.; SHARPLES, K.R.; MCINDOE, E. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Phillippines. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 637–646, 2008.

KNISS, A.R.; VASSIOS, J D.; NISSEN, S.J.; RITZ, C. Nonlinear regression analysis of herbicide absorption studies. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 601-610, 2011.

KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 53, p. 84-89, 2005.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, M.A.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and clustal X version 2.0, **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LASAT, M.M.; DITOMASSO, J.M.; HART, J.J.; KOCHIAN, L.V. Resistance to paraquat in *Hordeum glaucum* is temperature dependent and not associated with enhanced apoplastic binding. **Weed Research**, Oxford, v. 36, p. 303–309, 1996.

LASAT, M. M.; DITOMASO, J. M.; HART, J. J.; KOCHIAN, L. V. Evidence for vacuolar sequestration of paraquat in roots of a paraquat-resistant *Hordeum glaucum* biotype. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 99, p. 255–262, 1997.

LOPEZ-OVEJERO, R.F.; PENCKOWSKI, L.H.; PODOLAN, M.J.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas de manejo químico da planta daninha *Digitaria ciliaris* resistente aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura de soja. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v.24, n.2, p. 407-414, 2006.

MOSS, S.R.; CUSSANS, G.W. Variability in the susceptibility of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) to chlortoluron and isoproturon. **Aspects of Applied Biology**, Los Angeles, v. 9, p. 91–98, 1985.

PADGETTE, S.R.; RE, D.B.; GASSER, C.D.; EICHHOLTZ, D.A.; FRAZIER, R.B.; HIRONAKA, C.M.; LEVINE, E.B.; SHAH, D.M.; FRALEY, R.T.; KISHORE, G. M. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. **The Journal of Biological Chemistry**, Fort Collins, v. 266, p. 22364-22369, 1991.

PÉREZ, A.; ALISTER, C.; KOGAN, M. Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resistant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. **Weed Biology and Management**, Malden, v. 4, p. 56-58, 2004.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berkeley, v. 226, p. 395-404, 2007.

POWLES, S.B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**.West Sussex, v. 64, p. 360–365, 2008.

PRESTON, C.; TARFI, F.J.; CHRISTOPHER, J.T.; POWLES, S.B. 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**, Massachusetts, v. 54, p. 123–134, 1996.

PRESTON, C.; SOAR, C.J.; HIDAYAT, I.; GREENFIELD, K.M.; POWLES, S.B. Differential translocation of paraquat in paraquat-resistant population of *Hordeum leporinum*. **Weed Research**, Oxford, v. 45, p.289-295, 2005.

PRIESTMAN, M.A.; FUNKE, T.; SINGH, I.M.; CRUPPER, S.S.; SCHONBRUNN, E. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 579, p. 728-732, 2005.

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; JOHNSON, D.B.; SCOTT, R.C.; BAGAVATHIANNAN, M. Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 299-304, 2011.

SOAR, C.J.; KAROTAM, J.; PRESTON, C.; POWLES, S.B. Reduced paraquat translocation in paraquat resistant *Arctotheca calendula* (L) Levyns is a consequence of the primary resistance mechanism, not the cause. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Massachusetts, v. 76, p. 91–98, 2003.

STALKER, D.M.; HIATT, W.R.; COMAI, L. A single amino acid substituition in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. **The Journal of Biological Chemistry**, Fort Collins, v. 260, p. 4724-4728, 1985.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Lawrence, v. 50, p. 700-712, 2002.

VÁRADI, G.; DARKÓ, É. LEHOCZKI, E. Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* (L.) Cronq. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 123, p. 1459-1469, 2000.

WAKELIN, A.M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 432–440, 2006.

WEAVER, L.M.; HERMANN, K.M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends in Plant Science,** Cambridge, v. 2, p. 346–351, 1997.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS, R.D.; POWLES, S.B. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**. Waterbury, v.167, p.1440-1447, 2015.

YU, Q.; CAIRNS, A.; POWLES, S.B. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta**, Berkeley, v. 225, p. 499-513, 2007.

YU, W.; CAIRNS, A.; POWLES, S.B. Paraquat resistance in a biotype of *Lolium rigidum*. **Functional Plant Biology***,* Collingwood, v. 31, p. 247-254, 2004.

YUAN, J.S.; TRANEL, P.J.; STEWART JR., A.N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2006.

ZAGNITKO, O.; JELENSKA, J.; TEVZADZE, G.; HASELKOM, R.; GORNICKI, P. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 6617-6622, 2001.

5 HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DA PLANTA DANINHA *Digitaria insularis* AO GLYPHOSATE

Resumo

O fluxo de genes via polém e a herança genética da resistência ao glyphosate em capim-amargoso (*Digiaria insularis*) não têm sido previamente caracterizado. Estas informações são essenciais para o entendimento da taxa de evolução de resistência a herbicidas na agricultura, e o fluxo gênico entre plantas resistentes e suscetíveis em uma área. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi quantificar herdabilidade dos genes de resistência entre os biótipos resistente e suscetível ao glyphosate, através da determinação do grau de suscetibilidade dos biótipos na progênie F1. Para isso foi comparada a suscetibilidade da geração F1 dos biótipos resistente (MG) e suscetível (S), que permaneceram isolados ou induzidos á polinização cruzada através do acondicionamente de suas panículas em sacos de polinização. O grau de suscetibilidade ao glyphosate foi medido através de curvas de dose-resposta da progênie F1. A geração F1 de plantas oriunda de um possível cruzamento entre os biótipos demonstrou o mesmo padrão de suscetibilidade ao glyphosate que a progênie oriunda da planta mãe. Comparando as médias dos biótipos resistentes com os suscetíveis ao glyphosate foi calculado um fator de resistência de 4,01. Conclui-se que não há a transferência de genes de resistência após indução ao cruzamento entre biótipos suscetível e resistente, sendo necessários mais estudos para determinar se este fato ocorreu devido à espécie *D. insularis* ser exclusivamente autógama ou se a resistência é determinada por maior número de alelos, e assim não segue o modelo de hereditariedade monogênica. Desta forma, a dispersibilidade dos genes de resistência do capim-amargoso pode ser atribuída à disseminação de suas sementes, e não à transferência gênica entre biótipos pela polinização cruzada entre plantas, pois o trabalho evidência fecundação cruzada em taxas imperseptívies pelo estudo.

Palavras-chave: Cruzamento; Capim-amargoso; Resistência; Progênie

Abstract

The gene flux through polen and glyphosate resistance genetic inheritance in sourgrass (*Digitaria insularis*) was not previously characterized. These informations are essential for the understanding of herbicide resistance evolution rate in agriculture and the gene flux between resistant and susceptible biotypes in the field. Therefore, the objective of this research was to quantify resistance gene inheritance among glyphosate resistant and susceptible biotypes, through the determination of the level of susceptibility to the herbicide in the F1 progeny. it was compared to the F1 generation susceptibility of resistant biotypes (MG) and susceptible (S), which remained isolated or induced to cross-pollination through pollination bags. The sensitivity to glyphosate was measured in the F1 progeny using dose-response curves. The F1 generation plants originating from a possible crossing between biotypes showed the same pattern of glyphosate susceptibility than the parent plant. Comparing the average of glyphosate resistant with susceptible biotypes a resistance factor of 4.01 was calculated. We conclude that there is no transfer of resistance genes after cross-pollination induction between susceptible and resistant biotypes.

Further research is needed to determine if this occurred due to *D. insularis* species be exclusively autogamous or if the resistance is determined by more alleles, and thus does not follow the model of monogenic inheritance. Therefore, the dispersibility of sourgrass resistance genes can be attributed to seed dispersal and not for gene transfer between biotypes through cross pollination among plants, since this study shows imperceptible cross-pollination rates.

Keywords: Crossing; Sourgrass; Resistance; Progenie

5.1 Introdução

O propósito do manejo de plantas daninhas é minimizar as perdas de produtividade das culturas devido à interferência, evitar condições de colheita desfavoráveis, reduzir o incremento do banco de sementes de plantas daninhas e seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas; tudo isso com o menor impacto ao ambiente possível, resultando também em lucratividade ao produtor. A utilização de herbicidas para o controle de plantas daninhas se tornou a prática mais utilizada, uma vez que apresenta menor custo, quando comparado com outros métodos de controle, e de alta eficácia agronômica (OLIVEIRA Jr.; CONSTANTIN; INOUE, 2011). O glyphosate é o herbicida mais utilizado globalmente, sendo aplicado há mais de 40 anos em diversos sistemas de produção. A adoção de culturas resistentes a este herbicida e a queda da sua patente no ano de 2000, podem ter contribuído para sua ampla aceitabilidade e adoção (DUKE; POWLES, 2008; GIANESSI, 2004). Esse herbicida tem como mecanismo de ação a inibição da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (EC 2.5.1.19), que é a enzima responsável pela reação de condensação do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em EPSP e fosfato inorgânico, na rota do ácido chiquímico (GEIGER; FUCHS, 2002).

A inibição da EPSPs resulta no acúmulo de ácido chiquímico e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, triptofano e tirosina que são fundamentais para a alocação do carbono nas plantas, além de interferir na produção de flavonas, isoflavonas, antocianinas, taninos condensados, ligninas e outros compostos fundamentais para o desenvolvimento vegetal (AMRHEIN et al., 1980; TAIZ; ZEIGER; 2013).

As plantas daninhas estão continuamente evoluindo estando sujeitas à seleção natural causada por diversos fatores, como o uso de herbicidas. A resistência de

plantas daninhas a herbicidas é a seleção natural em uma população selvagem devido à ação de um agente selecionador, neste caso o herbicida. Os biótipos resistentes selecionados se tornaram um dos maiores desafios nos sistemas agrícolas recentemente, sobretudo pelo fato de um número exponencial de novos casos de resistência terem sido reportados nas últimas décadas, nos mais diversos sistemas de produção, associados à alta dependência de herbicidas (JASIENIUK et al., 2008).

De acordo com Gunsolus (2008), biótipo pode ser definido como um conjunto de indivíduos, dentro de uma população, que possuem características fenotípicas semelhantes, mas que diferem em poucas características genéticas.

Resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Uma das espécies de planta daninha que sofreu grande pressão de seleção pelo uso indiscrimado de glyphosate e está disseminada pelas regiões agrícolas do país, é o capim-amargoso (*Digitaria insularis*). O primeiro caso relatado sobre o surgimento de um biótipo de *Digitaria insularis* (capim-amargoso) resistente ao glyphosate, veio do Paraguai, no ano de 2006 (HEAP, 2015). Esta espécie possui características como a capacidade de formação de rizomas e touceiras, sendo uma espécie de ciclo perene com metabolismo fotossintético do tipo C4, além de dispersar suas sementes utilizando correntes de vento por possuir sementes com pilosidade (CLAYTON et al., 2006; LORENZI, 2008; KISSMANN; GROTH, 1997). Estas características, aliadas ao grande percentual germinativo, faz com que esta espécie tenha alta capacidade de disseminação.

Apesar das práticas agronômicas influenciarem a seleção de biótipos resistentes a herbicidas, fatores ligados à genética da planta e a bioecologia da mesma apresentam papel fundamental no desenvolvimento da resistência. Dentre estes fatores está a frequência inicial de biótipos resistentes, dominância dos genes que proporcionam resistência, tipo de fecundação, adaptação ecológica, número de gerações por ano, taxa de reprodução, longevidade dos propágulos no solo e

suscetibilidade da planta ao herbicida (MATIELLO; RONZELLI JÚNIO; PURÍSSIMO,1999). Portanto estudar a hereditariedade e transmissão das características de resistência a herbicidas se torna importante.

O primeiro passo após o surgimento de biótipos suspeitos de resistência de plantas daninhas a herbicidas é realizar testes experimentais comprobatórios da resistência (BURGOS et al., 2013; OWEN, 2011). Sendo assim, curvas de dose-resposta são realizadas com o intuito de comparar biótipos suspeitos de resistência com biótipos conhecidamente suscetíveis (BECKIE et al., 2000).

O fluxo de genes de resistência de uma população resistente a determinado herbicida para outra população suscetível pode se dar pela imigração das sementes e também pela dispersão do polén, caso haja polinização cruzada entre as plantas desta espécie. Portanto, populações em que a taxa de fluxo gênico ocorre através de polinização cruzada terão maiores taxas de dispersão da resistência na população (JASIENIUK *et al.*, 1996). Assim, o fluxo gênico pode aumentar a frequência de alelos e, desta forma indivíduos resistentes na população.

A compreensão dos padrões de herança de características de resistência, bem como o potencial de cruzamento pode ajudar a prever a probabilidade e a velocidade de propagação da resistência a herbicida em uma espécie (Maxwell; Mortimer, 1994). A disseminação da resistência a herbicida controlada por herança poligênica será mais lenta do que quando um único alelo dominante está envolvido (Maxwell e Mortimer 1994).

O padrão de herança da resistência do capim-amargoso ao glyphosate não é conhecido. Sendo assim, o objetivo é quantificar a taxa de cruzamento de biótipos resistentes e suscetível ao glyphosate e determinar o padrão de herança de genes que conferem resistência.

5.2 Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, com irrigação diária de aproximadamente 4 mm distribuídos durante o dia, no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015, utilizando como biótipo suscetível oriundo de uma área sem histórico de aplicação de glyphosate do município de Iracemápolis – SP (S)

cujas coordenadas geográficas são S 22^0 39' 17.1'' O 47^0 29' 32.39'', enquanto que a população proveniente do município de Campo Florido em Minas Gerais (MG), cujas coordenadas geográficas são Sul 19°45'48.80'' Oeste 48°34'19.47'', a qual sobreviveu a uma dose de glyphosate de 1440 g.e.a.ha^{-1}, sendo o biótipo considerado como resistente ao herbicida.

Os biótipos foram semados em bandejas preenchidas com substrato comercial adubado, onde germinaram e em seguida transplantadas quatro plantas para vasos plásticos de 10 L, onde permaneceram até a produção de sementes. Durante a fase de emissão da inflorescência, foram ensacadas em sacos de polinização panículas de forma que tivessem uma panícula do biótipo S junto com uma do biótipo MG (SxMG); uma panícula do biótipo MG junto com uma do biótipo S (MGxS); somente uma panícula do biótipo S (S) e somente um panícula do biótipo MG (MG). Após a maturação das sementes as inflorescências foram separadas e designadas de acordo com sua planta de origem vindo primeiramente na nomenclatura adotada, sendo a planta mãe S ensacada com uma panícula MG com a nomenclatura “SxMG”, a planta mãe MG ensacada com uma panícula S com a nomenclatura “MGxS” e as que foram ensacadas sozinhas nomeadas com a sigla do biótipo materno, “S” ou “MG” apenas.

Na segunda etapa foram semeadas as panículas S, MG, SxMG e MGxS em bandejas preenchidas com substrato comercial adubado, onde permaneceram até a emergência sendo transpladas duas plantas por vaso plástico de 1,0 L também preenchidos com substrato comercial adubado e conduzidas até o estádio vegetativo 23, segundo a escala de BBCH (HESS et al., 1997) quando os tratamentos foram aplicados utilizando um pulverizador costal, trabalhando a uma pressão constante de 2,0 bar e pressurizado com CO_2, equipado com ponta do tipo leque Teejet XR 110.02, com um volume de calda correspondente a 200 L.ha^{-1}. Cada população foi submetida aos tratamentos herbicidas constituídos de sete doses de glyphosate: 120, 240, 480, 960, 1.920, 3.840, 7.680 g e.a. ha^{-1}, bem como a testemunha sem aplicação do herbicida glyphosate. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e oito tratamentos, somando assim 32 parcelas por população aplicada.

Após a aplicação dos tratamentos foram realizadas avaliações visuais percentuais de controle aos 7, 14, 21 e 28 dias após os tratamentos, onde 0 representava ausência total de sintomas, e 100, morte da planta. Após a última avaliação visual de controle foi realizada a coleta da parte aérea das plantas para mensuração de massa seca, após secagem em estufa até peso constante.

Os dados obtidos nos experimentos foram inicialmente submetidos à aplicação do teste F sobre a análise de variância. Em seguida foram ajustados ao modelo de regressão não-linear do tipo logístico no qual as variáveis controle e massa seca foram ajustadas ao modelo proposto por Knezevic et. al. (2007), com a equação abaixo.

$$y = d/1 + exp[b\,(log\,x - log\,e)]$$

Em que: y é a variável avaliada, x é a dose do herbicida e “b”, “d” e “e” são parâmetros da curva, de modo que “b” é a declividade da curva, “d” é o limite superior da curva e “e” a dose que proporciona 50% de resposta da variável.

O modelo logístico apresenta vantagens uma vez que um dos termos integrantes da equação é uma estimativa do valor de C50 ou de GR50 (CHRISTOFFOLETI, 2002). O C50 (controle de 50% da população) e o GR80 (redução de 50% do crescimento) são as doses do herbicida que proporcionam 50% de controle ou de redução de massa da planta daninha, respectivamente (CHRISTOFFOLETI, 2002; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2004). Os resultados para a obtenção de uma média de controle aceitável para utilização como dose base para comparação das populações no experimento de mapeamento foi dada pelo uso do C80 e GR80 (80% de controle) fornecidos pelo modelo estatístico usado no programa R.

5.3 Resultados e Discussão

Os parâmetros obtidos através da regressão não linear para a avaliação de controle visual e redução de crescimento, estão descritos na Tabela 5.1. É possível evidenciar a diferença entre as populações que foram consideradas suscetíveis (S e SxMG), daquelas que foram consideradas resistentes (MG e MGxS) ao comparar as doses obtidas pelo modelo dentro das colunas DE50 e DE90 mostrados na Tabela

5.2. Com isso podemos notar que mesmo após a condução das panículas ensacadas entre os biótipos S e MG, a geração oriunda de um possível cruzamento demonstrou o mesmo padrão de suscetibilidade ao glyphosate que a planta mãe, ou seja, o biótipo SxMG apresentou alta suscetibilidade ao herbicida assim como a planta mãe S e o biótipo MGxS demonstrou resistência ao herbicida como a planta mãe MG. Este fato pode ser visualizado claramente nas curvas de dose resposta apresentadas nas Figuras 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 – Parâmetros da equação de curva de dose-resposta utilizando os dados de controle visual e redução de crescimento percentual, gerados para as populações S, S x MG, MG e MG x S de *Digitaria insularis*. Piracicaba, 2015

	População	**b ± SE**	**d ± SE**	**e ± SE**
Controle visual	S	-2,033 ± 0,244	101,435 ± 2,290	373,094 ± 25,139
	S x MG	-1,882 ± 0,224	101,730 ± 2,412	412,239 ± 29,259
	MG	-1,017 ± 0,121	113,303 ± 6,206	1227,423 ± 196,539
	MG x S	-1,060 ± 0,124	112,312 ± 5,622	1150,987 ± 166,328
		b ± SE	**d ± SE**	**e ± SE**
Massa seca	S	1,934 ± 0,309	99,910 ± 4,929	422,245 ± 45,963
	S x MG	2,206 ± 0,395	98,430 ± 4,832	456,332 ± 47,284
	Campo Florido - MG (MG)	1,337 ± 0,217	94,345 ± 5,104	1080,404 ± 184,734
	MG x S	1,457 ± 0,229	95,577 ± 4,776	1030,892 ± 154,782

“b” é a declividade da curva, “d” é o limite superior da curva e “e” a dose que proporciona 50% de resposta da variável. *Erro padrão do modelo. Modelo proposto por Knezevic et. al. (2007),y= d/1+ exp[b (log x - log e)]

Tabela 5.2 – Doses estimadas (DE) para o controle ou redução de crescimento de 50% e 90% (DE50 e DE90) das populações S, S x MG, MG e MG x S de *Digitaria insularis*, e o desvio padrão. Piracicaba, 2015

Dados avaliados	População	DE* 50 (g e.a.ha^{-1})	Erro Padrão	DE* 90 (g e.a.ha^{-1})	Erro Padrão
Controle Visual (%)	S	373,09	±25,14	1099,1	±167,96
	S x MG	412,24	±29,259	1324,9	±217,86
	MG	1227,42	±196,54	10628,1	±4068,66
	MG x S	1150,99	±166,328	9142,1	±3210,31
Redução de crescimento (%)	S	422,25	±45,964	1314,7	±235,37
	S x MG	456,33	±47,284	1235,4	±205,00
	MG	1080,4	±184,735	5582,6	±1178,99
	MG x S	1030,89	±154,782	4653,7	±927,75

* Dose estimada da equação do modelo proposto por Knezevic et. al. (2007), y= d/1+ exp[b (log x - log e)]

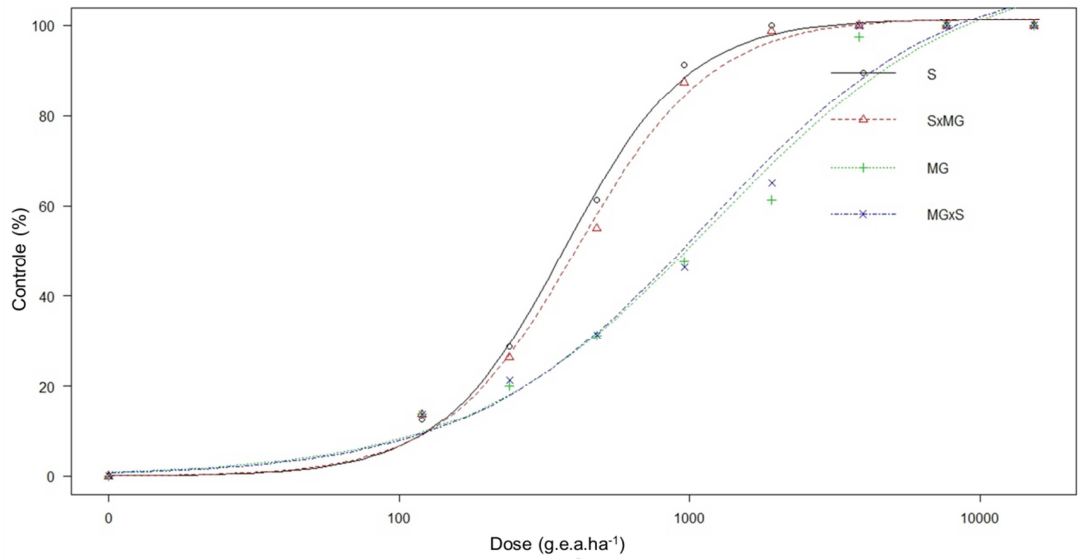

Figura 5.1 - Curva de dose-resposta utilizando os dados de controle visual percentual para as populações S, S x MG, MG e MG x S. Piracicaba, 2015

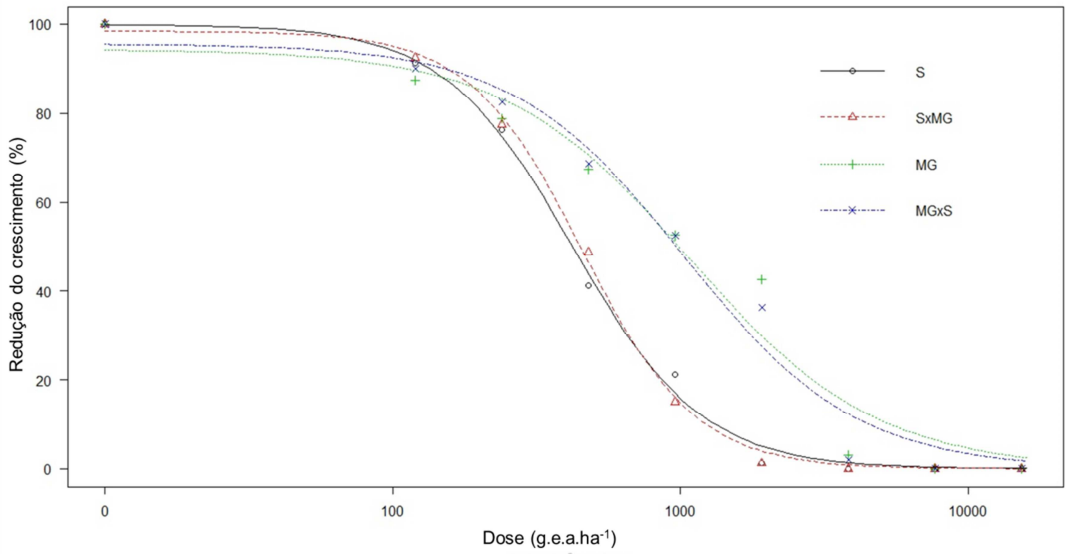

Figura 5.2 – Curva de dose-resposta utilizando os dados de redução do crescimento percentual para as populações S, S x MG, MG e MG x S. Piracicaba, 2015

Entre os biótipos resistentes (MG e MGxS), a dose necessária para reduzir o crescimento em 90% (BHS) variou entre 4653,7 (± 927,75) e 5582,6 (± 1178,99) g e.a. ha^{-1}, com dose média de 5118,15 g e.a. ha^{-1} de glyphosate enquanto que para os biótipos suscetíveis S e SxMG a dose necessária para reduzir o crescimento em 90% variou entre 1235,4(± 205) e 1314,7 (± 235,37) g e.a. ha^{-1}, com dose média de 1275,05 g e.a. ha^{-1} de glyphosate. Comparando as médias dos biótipos resistentes com os suscetíveis ao glyphosate chegamos a um fator de resistência de 4,01, caracterizando a diferença de suscetibilidade entre os biótipos. Brunharo (2014) em sua dissertação de mestrado verificou que para reduzir o crescimento em 95%, a população com suspeita de resistência necessitaria quase 13 vezes mais herbicida quando comparada com a população suscetível de *Chloris elata*. Norsworthy, et.al. (2008) baseando-se na comparação entre biótipos resistente e suscetível de *Amaranthus palmeri*, encontrou uma diferença de 79 a 115 vezes maior e uma diferença de 3,4 vezes para dose de glyphosate recomendada para aplicação no campo. Trainer, et.al. (2005) encontrou um fator de resistência ao glyphosate de 33 e 39 vezes ao estudar biótipos de buva. Alacón-Reverte et al. (2013), estudaram

duas populações da planta daninha *Echinochloa colona* na Califórnia através de experimentos de dose-resposta e encontraram seu fator de resistência de 6,6, com base na DE50. Esse valor encontrado é similar ao encontrado por Travlos e Chachalis (2010), que calcularam o fator de resistência para a espécie *Conyza bonariensis* variando entre 4 e 7 vezes, porém maior que os encontrados por Ng et al. (2004) para a espécie *Eleusine indica* da Malásia. Mueller et al. (2011), pesquisando através de experimentos de dose-respostas sobre a possível existência de resistência de *Eleusine indica* ao glyphosate no Tennessee (EUA) com dois biótipos (um com suspeita de resistência e outro conhecidamente suscetível), descobriram um fator de resistência equivalente a 7,4. Plantas escapes de *Sorghum halepense* provenientes de áreas onde o herbicida glyphosate vinha sendo usado em lavouras de soja por mais de 6 anos, apresentaram fator de resistência da ordem de 7,3 vezes após o estudo através de curvas de dose-resposta (RIAR et. al., 2011).

Carvalho et al. (2011), estudando a planta daninha *Digitaria insularis* em casa de vegetação, obteve controle visual de 50% utilizando o herbicida glyphosate nas doses de 63,6, 148,8, 249 e 248 g e.a. ha^{-1} para os biótipos S, R1, R2 e R3 (Suscetível, Resistente 1, Resistente 2 e Resistente 3), respectivamente, calculando um fator de resistência de 2,3 (população R1), 3,9 (população R2) e 3,9 (população R3).

Sendo as características de resistência de um biótipo de planta daninha intrínsecas ao DNA, podemos assumir que tais características sejam herdáveis (WSSA, 1998). Sendo assim, uma das hipóteses que podemos inferir baseando-se nos dados obtidos neste trabalho é que a característica de resistência ao glyphosate encontrada nestes biótipos de *D. insularis* pode ser influenciada por mais de uma alteração no genótipo dos biótipos resistentes (resistência poligênica), por não haver nenhuma mudança na resposta ao produto após o cruzamento.

Outra possível explicação para os resultados encontrados seria a de que a *D. insularis* é uma espécie autógama. Na literatura não existe nenhuma referência descrevendo a *D. insularis* como autógama ou halógama. Para *Conyza canadensis* de natureza autógama utilizando o modelo de hereditariedade simples para a resistência ao glyphosate, associado ao fato de que populações heterozigóticas sobreviveram a aplicações de doses bem acima do recomendado, foi possível prever

um rápido aumento na frequência do alelo que confere a resistência quando submetido à seleção contínua pelo glyphosate (ZELAYA; OWEN; VANGESSEL, 2004). Brown e Brown (1996) encontraram híbridos de *Brassica napus* resistente e *Brassica campestris* suscetível que expressaram resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

5.4 Conclusões

Não há fluxo gênico de resistência entre os biótipos suscetível e resistente, baseando-se nas condições estudadas neste experimento e utilizando como parâmetro de avalição curva de dose-resposta na progênie F1. Todavia, mais estudos são necessários para determinar se este fato ocorreu devido à espécie *D. insularis* ser 100% autógama ou se a resistência é determinada por maior número de alelos, e que, portanto, não segue o modelo de hereditariedade simples estudado neste trabalho.

Referências

ALACÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; URZÚA, J.; FISCHER, A. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 48-54, 2013.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate II: interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 66, p. 830-834, 1980.

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

BROWN, J.; BROWN, A. P.; Gene transfer between canola (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.) and related weed species. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 129, p. 513–522, 1996.

BRUNHARO, C.A.C.G. **Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris Polydactyla*) ao herbicida glyphosate.** 2014. p. 1-153. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; STREIBIG, J.A.; DAVIS, V.M.; SHANER, J.L.; NORSWORTHY, J.K.; RITZ, C. Review: confirmation of resistance to herbicides and evolution of resistance levels. **Weed Science**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 4-20, 2013.

CARVALHO, L.B.; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.L.C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRATO, R. Detection of sourgrass (Digitaria insularis) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, n. 2, p. 171-176, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicidas.** 2ª ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2004. p. 3-22.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 9-29.

CLAYTON, W.D.; VORONTSOVA, M.S.; HARMAN, K.T.; WILLIAMSON, H.; **Grass base:** the online world grass flora. 2006. Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Acesso em: 13 mar. 2015.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

GEIGER, D.R.; FUCHS, M.A. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (Ed.). **Herbicide Classes in Development**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 59-85

GIANESSI, L.P. Economic and herbicide use impacts of GR crops. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, p. 124-245, 2004.

GUNSOLUS, J.L. **Herbicide resistant weeds**. Disponível em: <www.extension.umn.edu/agriculture/crops/weed-management/herbicide-resistant-weeds>. Acesso em: 15 nov. 2015.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 20 nov. 2015.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHRS, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale – general for descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 37, p. 433-441, 1997.

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

JASIENIUK, M.; AHMAD, R.; SHERWOOD, A.M.; FIRESTONE, J.L.; PEREZ-JONES, A.; LANINI, W.T.; MALLORY-SMITH, C.; STEDNICK, Z. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 496– 502, 2008.

KISSMANN, K.G. ; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, v.1, 1997. p. 510-513.

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

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2008. p. 495.

MATIELLO, R.R.; RONZELLI JÚNIOR, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agronômicos e genéticos. In: CURSO DE MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS, 2., 1999, Ponta Grossa. **Anais**... Ponta Grossa: AEACG, p. 27-40,1999.

OLIVEIRA Jr., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. B**iologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba, PR: Omnipax, 2011. p. 348.

OWEN, M.D.K. Weed resistance development and management in herbicide-tolerant crops: experiences from the USA. **Journal Für Verbraucheschutz and Lebensmittelsicherheit**, Berlin, v. 6, p. 85-89, 2011.

MAXWELL, B.D.; MORTIMER, A.M. Selection for herbicide resistance. In: S.B. Powles; Holtum, J.A.M., (Eds.). **Herbicide Resistance in Plants:** Biology and Biochemistry. Boca Raton, FL: Lewis, 1994. p.1-26.

MUELLER, T.C.; BARNETT, K.A.; BROSNAN, J.T.; STECKEL, L.E. Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennesee. **Weed Science**, Lawrence, v. 54, n. 4, p. 562-566, 2011.

NG, C.H.; WICKENSWARY, R.; SURIF, S. ISMAIL, B.S. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed Science**, Lawrence, v. 52, p. 564–570, 2004.

NORSWORTHY, J.K.; MCCLELLAND, M.; GRIFFITH, G.M.; SCOTT, R. C.; SMITH, K. L.; OLIVER, L. R.; Confirmation and Control of Glyphosate-Resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) in Arkansas; **Weed Technology,** Cidade**,** v. 22, p. 108-113. 2008.

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; JOHNSON, D.B.; SCOTT, R.C.; BAGAVATHIANNAN, M. Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v. 59, p. 299-304, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 719.

TRAINER, G. D.; LOUX, M. M.; HARRISON, S. K.; REGNIER, E.; Response of Horseweed Biotypes to Foliar Applications of Cloransulam-methyl and Glyphosate. **Weed Technology**, Lawrence, v. 19, .n. 2, p. 231-236. 2005.

TRAVLOS, I.S.; CHACHALIS, D. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) is reported in Greece. **Weed Technology**, Lawrence, v. 24, p. 569-573, 2010.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Resistance and tolerance definitions. **Weed Technology**, Lawrence, v. 12, p. 789, 1998.

ZELAYA, I.A.; OWEN, M.D.K.; VANGESSEL, M.J. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 110, p. 58–70, 2004.